

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



UNICAMP

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE FRAGRÂNCIA EM DETERGENTE EM PÓ

POR CROMATOGRAFIA GASOSA

E

MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Autor: Robson Bonfim Godinho

Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli

Campinas - São Paulo

Fevereiro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

G545a Godinho, Robson Bonfim.
Avaliação de fragrância em detergente em pó por
cromatografia gasosa e métodos quimiométricos /
Robson Bonfim Godinho. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Cromatografia gasosa. 2. Fragrâncias.
3. Microextração em fase sólida. 4. Quimiometria.
I. Bottoli, Carla Beatriz Grespan. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of fragrance in powder detergent by gas chromatography and chemometrics

Palavras-chaves em inglês: Gas chromatography, Fragrances, Solid phase microextraction, Chemometrics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli (orientadora), Ronei de Jesus Poppi (IQ-UNICAMP), Claudimir Lúcio do Lago (IQ-USP-SP)

Data de defesa: 05/02/2009

*Dedico essa dissertação a minha
esposa Solânia por todo carinho,
incentivo e paciência que foram
determinantes na conclusão
desse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

É com grande alegria que agradeço a todos que me acompanharam durante esta jornada.

Primeiramente a Deus pela vida e pela oportunidade de continuar o meu desenvolvimento;

À Universidade Estadual de Campinas, em Especial ao Instituto de Química, e à Givaudan do Brasil pela possibilidade de realizar esse trabalho;

À minha orientadora, Prof^a Carla Beatriz, que me recebeu de forma acolhedora e sempre me incentivou, nos períodos de grande dificuldade e desânimo transmitindo confiança e perseverança durante esses anos;

Ao Maurício Cella e Tânia Fazzi que viabilizaram os meus primeiros passos na vida acadêmica;

Ao Prof^o Fábio Augusto e aos colaboradores de seu laboratório, Raquel e Adriano que me acompanharam nos primeiros experimentos.

A minha família, Solânia, Laís, Larissa, Luã e Sophia, aos meus pais Luiz e Inês e a minha avó Julia, pelo amor, pela compreensão e pela motivação que me deram nos momentos mais difíceis.

A todos que estiveram presentes, direta ou indiretamente, meu muito obrigado.

CURRICULUM VITAE

Formação Acadêmica

I. Mestrado em Química Analítica com ênfase em Cromatografia Gasosa e Métodos Quimiométricos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, SP, Brasil, Período: 03/2005 – 02/2009.

II. Bacharelado em Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, SP, Brasil, Período: 02/1999 – 01/2005.

III. Técnico em Bioquímica, Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antonio Prado” ETECAP, Campinas, SP, Brasil, Período: 02/1992 – 12/1995.

Comunicações em Congressos

I. Godinho, R. B.; Calderine, A.; Klassen, A.; Queiroz, C.; Montrazzi, D.; Favaro, M.; Borges, S. S. O.; Bueno, M. I. M. S. “X-Ray Spectroscopy and multivariate calibration applied to soil samples”, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, CAC, 2006, Campinas, SP.

II. Godinho, R. B.; Sobral E. A.; Fazzi T.; Ferreira M. M. C.; Bottoli C. B. G. “Multivariate calibration for determination of density and refractive index in fragrance from chromatographic profiles determined by GC-FID”, II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, SIMCRO, 2006, São Pedro, SP.

III. Godinho, R. B.; Fazzi, T.; Bottoli, C. B. “Análise de fragrância em detergente em pó por HS-SPME / GC-FID e análise dos componentes principais”, 14^o Encontro Nacional de Química Analítica, ENQA, 2007, João Pessoa, PB.

Atividades Profissionais

I. Analista de Perfumaria – Givaudan do Brasil Ltda. Período: Desde 09/2008.

II. Coordenador de Controle de Qualidade – Givaudan do Brasil Ind. de Aromas e Fragrâncias Ltda. Período: 06/2006 – 09/2008.

III. Analista de Controle de Qualidade – ICI Especialidades Químicas Ltda. Período: 04/1998 – 06/2006.

RESUMO

Fragrância é uma mistura de moléculas orgânicas como ésteres, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos, alcoóis, entre outras, tendo como fontes substâncias de origem natural ou sintética, que quando combinadas em proporções harmônicas conferem uma característica odorífera ímpar em um perfume ou em um produto perfumado. Considerando essa característica, a primeira etapa desse trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise dos compostos voláteis provenientes de uma fragrância por cromatografia gasosa utilizando a técnica de micro-extração em fase sólida no *headspace*, (em inglês, Headspace – Solid Phase Micro Extraction, HS-SPME). Esse método foi utilizado para monitoramento da fragrância após sua aplicação no detergente em pó em diferentes condições de estocagem. Os dados obtidos após a extração e análise cromatográfica foram tratados com ferramentas quimiométricas, como HCA, (do inglês, Hierarchical Cluster Analysis), e PCA, (do inglês, Principal Component Analysis), para auxiliar na interpretação do conjunto de dados. Os métodos quimiométricos possibilitaram a identificação de grupos em gráficos bidimensionais, os quais mostram a variação das amostras de detergente com o tempo e o ambiente de estocagem. Devido à necessidade das indústrias de fragrâncias analisarem vários aspectos físico-químicos dos produtos que trabalham como, a matéria prima e o produto acabado, para seu controle de qualidade, a segunda etapa desse trabalho baseou-se no desenvolvimento de um modelo de calibração multivariada, PLS, (do inglês, Partial Least Squares) para previsão de propriedades físicas das fragrâncias, densidade e índice de refração, a partir de dados cromatográficos. As análises foram baseadas em uma matriz com 45 amostras de diferentes fragrâncias e 675 variáveis. O modelo obtido apresentou uma boa capacidade de previsão, apresentando para esses dados um erro relativo menor que 1,0 % para a densidade e 0,5 % para o índice de refração, evidenciando a possibilidade de prever dados físico-químicos de fragrâncias com excelente precisão a partir de análises cromatográficas.

ABSTRACT

Fragrance is a mixture of organic molecules such as esters, ketones, aldehydes, hydrocarbons and alcohols, among others, using as sources substances of natural or synthetic origin, which, when combined in harmonious proportions, confer a unique characteristic to a perfume or a scented product. Considering this feature, the first stage of this work was the development of a method of analysis of volatile compounds from a fragrance by gas chromatography using the technique of Headspace - Solid Phase Micro Extraction, HS-SPME. This method was used to monitor the fragrance after its application in detergent powder under different conditions of storage. The data obtained after the extraction and chromatographic analysis were treated with chemometric tools, such as HCA, Hierarchical Cluster Analysis, and PCA, Principal Component Analysis, to assist in the interpretation of the data set. The chemometric methods allowed the identification of groups in two-dimensional graphs, which show the variation of samples of detergent with time and storage environment. Due to the need of the fragrance industries to examine various aspects of the physical-chemical products that work as the raw material and finished product, for their quality control, the second stage of this work was based on the development of a model of multivariate calibration, PLS, Partial Least Squares, for prediction of the physical properties of fragrances, such as density and index of refraction, from the chromatographic data. The tests were based on a matrix with 45 samples of different fragrances and 675 variables. The model obtained showed a good capability for prediction, with a relative error of less than 1.0% for density and 0.5% for the index of refraction. This shows the possibility of predicting physico-chemical data of fragrances with good precision from chromatographic analysis.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE FIGURAS	xix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica	4
1.1. <i>Fragrâncias</i>	4
1.1.1. Composição química das fragrâncias.....	4
1.1.2. Fatores que influenciam a volatilidade de substâncias odorantes	5
1.2. <i>Cromatografia Gasosa</i>	7
1.3. <i>Técnicas de preparo de amostra para análise de fragrâncias</i>	8
1.3.1. Métodos Clássicos	9
1.3.1.1. Extração Direta.....	9
1.3.1.2. Destilação	9
1.3.2. Métodos modernos	10
1.3.2.1. Amostragem estática do espaço livre – <i>Headspace</i> Estático.....	10
1.3.2.2. Amostragem dinâmica no espaço livre – <i>Headspace</i> Dinâmico.....	11
1.3.2.3. Extração com fluido supercrítico.....	12
1.3.2.4. Microextração em Fase Sólida (SPME).....	13
1.4. <i>Métodos Quimiométricos</i>	15
1.4.1. Análise exploratória de dados	16
1.4.1.1. Pré-tratamento dos dados	18
1.4.1.2. Agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA)	20
1.4.1.3. Análise por componentes principais (PCA).....	21
1.4.2. Calibração multivariada.....	23
1.4.2.1. Mínimos quadrados parciais (PLS).....	26
CAPÍTULO 2 – Avaliação de fragrância em detergente em pó após diferentes condições de estocagem.	28

2.1.	<i>Introdução</i>	28
2.2.	<i>Objetivo</i>	29
2.3.	<i>Experimental</i>	29
2.3.1.	Materiais	29
2.3.2.	Reagentes	30
2.3.3.	Instrumental	30
2.3.4.	Preparo das amostras	31
2.3.4.1.	Criação da Fragrância	31
2.3.4.2.	Aplicação do óleo no detergente em pó para otimização das condições de extração por SPME.....	31
2.3.4.3.	Aplicação do óleo no detergente em pó para quantificação dos componentes da fragrância.	32
2.3.4.4.	Aplicação do óleo para o estudo de estabilidade após diferentes condições de armazenamento	32
2.3.5.	Condições de extração por SPME	33
2.3.6.	Análise cromatográfica.....	33
2.4.	<i>Resultados e discussão</i>	34
2.4.1.	Otimização das condições cromatográficas	34
2.4.2.	Otimização da metodologia de extração por HS-SPME-GC-FID.....	36
2.4.2.1.	Seleção de Fibra	37
2.4.2.2.	Quantidade de amostra	39
2.4.2.3.	Efeito da temperatura	39
2.4.2.4.	Efeito do tempo de pré-equilíbrio.....	41
2.4.2.5.	Efeito do tempo de adsorção.....	42
2.4.3.	Quantificação dos componentes da fragrância no detergente em pó.	44
2.4.3.1.	Curva analítica	44
2.4.3.2.	Monitoramento de cada componente da fragrância após os períodos de armazenagem.....	47
2.4.4.	Análise quimiométrica dos dados.....	52
2.4.4.1.	Análise exploratória de todas as amostras	52
2.4.4.2.	Análise exploratória das amostras perfumadas	55
2.4.4.3.	Seleção de variáveis das amostras perfumadas.....	58

Capítulo 3 - Previsão de densidade e índice de refração a partir de dados cromatográficos.	66
3.1. <i>Introdução</i>	66
3.2. <i>Objetivo</i>	67
3.3. <i>Experimental</i>	67
3.3.1. Reagentes	67
3.3.2. Instrumental	67
3.3.3. Preparo das amostras	68
3.3.4. Análise cromatográfica	68
3.3.5. Análise da densidade e índice de refração	69
3.4. <i>Resultados e discussão</i>	69
3.4.1. Construção do modelo para densidade	73
3.4.2. Construção do modelo para índice de refração	75
3.4.3. Resultados de previsão para densidade e índice de refração.	77
Conclusões	79
Referências Bibliográficas	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fórmula molecular dos compostos utilizados na elaboração da fragrância e seu tempo de retenção para as duas colunas.	35
Tabela 2: Parâmetros obtidos através das curvas analíticas. (a: inclinação da curva, b: intercepto, r: fator de correlação, LQ: limite de quantificação).	47
Tabela 3: Concentração dos componentes das fragrâncias após diferentes períodos e condições de armazenamento.	48
Tabela 4 - Resultados medidos de densidade e índice de refração para todas as fragrâncias avaliadas.	71
Tabela 5: Resultado dos parâmetros para definição do número de fatores usados no modelo para densidade.	74
Tabela 6: Resultado dos parâmetros para definição do número de fatores usados no modelo para Índice de Refração.	76
Tabela 7: Valores de previsão para densidade e índice de refração utilizando o modelo PLS.	77
Tabela 8: Dados obtidos após o uso do modelo para previsão das propriedades físicas das fragrâncias.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatogramas obtidos da fragrância pura. (A) coluna capilar CP-WAX 58 (FFPA) CB, 25 m x 0,25 mm x 0,2 μm , temperatura inicial 70 $^{\circ}\text{C}$, aquecimento 10 $^{\circ}\text{C}$ / min até 150 $^{\circ}\text{C}$ e 13 $^{\circ}\text{C}$ / min até a temperatura final 250 $^{\circ}\text{C}$ mantida por 8 minutos, temperatura do injetor e detector foram mantidas 200 $^{\circ}\text{C}$ e 300 $^{\circ}\text{C}$, hidrogênio com gás de arraste com pressão 15,0 psi e fluxo 3,2 mL / min. (B) coluna capilar BP1, 25 m x 0,22 mm x 0,25 μm , temperatura inicial 70 $^{\circ}\text{C}$, aquecimento 10 $^{\circ}\text{C}$ / min até 150 $^{\circ}\text{C}$ e 13 $^{\circ}\text{C}$ / min até a temperatura final 250 $^{\circ}\text{C}$ mantida por 8 minutos, temperatura do injetor e detector foram mantidas 200 $^{\circ}\text{C}$ e 300 $^{\circ}\text{C}$, hidrogênio com gás de arraste com pressão 15,0 psi e fluxo 1,9 mL / min. 35

Figura 2: Área total dos picos da fragrância para as quatro fibras. PDMS (100 μm polidimetilsiloxano); PDMS / DVB (65 μm polidimetilsiloxano / divinilbenzeno); CW / DVB (65 μm carbowax / divinilbenzeno) e CAR / PDMS (75 μm carboxen / polidimetilsiloxano). 37

Figura 3: Extração de cada componente pelas fibras PDMS / DVB e PDMS empregando a coluna BP1 (FID_2). 38

Figura 4: Área de todos os picos referente ao perfume em função da quantidade de amostra colocada no frasco empregando a coluna BP1 (FID_2). 39

Figura 5: Efeito da temperatura na extração dos componentes da fragrância. 40

Figura 6: Resposta na extração de cada componente em função da temperatura empregando a coluna BP1 - FID_1. 41

Figura 7: Área total dos picos da fragrância obtidas nos detectores FID_1 e FID_2 em função do tempo de pré - equilíbrio.	42
Figura 8: Resposta dos picos relacionados à fragrância nos dois detectores, FID_1 e FID_2, em função do tempo de adsorção.....	42
Figura 9: Perfil de extração para cada componente em função do tempo de equilíbrio. Resposta obtida com a coluna BP1 detector FID_2.....	43
Figura 10: Curvas analíticas para os diferentes componentes da fragrância empregando as colunas CP-WAX 58 e a BP1	46
Figura 11: Variação percentual da área do pico cromatográfico dos compostos da fragrância em cada situação de armazenagem. Os dados foram calculados considerando a amostra a 4 °C como referência.....	50
Figura 12: Indicação da variação de massa no transcorrer do período de armazenagem. G: Temperatura 4°C; Y: temperatura 35°C e umidade 70%; R: temperatura 45°C; 2: duas semanas; 4: quatro semanas; 8: oito semanas e 12: doze semanas.	51
Figura 13: Dendograma separando as amostras com perfume (marrom) e as amostras sem perfume (verde). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C); S amostras sem perfume; 2, 4, 8, 12 – números de semana e A, B e C número de replicatas.	53
Figura 14: Gráfico de <i>scores</i> (a) e gráfico de <i>loadings</i> (b). Variância explicada na PC1 (52,4%) e na (PC2 19,7%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C); S amostras sem perfume; 2, 4, 8, 12 – números de semana e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de <i>loadings</i> correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma.....	54
Figura 15: Dendograma separando as amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas.....	56

Figura 16: Gráfico de *scores* (a) e o gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (57.3%) e na PC2 (20.5%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de *loadings* correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma. 57

Figura 17: Dendograma separando as amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas..... 59

Figura 18: Gráfico de *scores* (a) e o gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (62.5%) e na PC2 (24.2%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de *loadings* correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma. 60

Figura 19: Dendograma das amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. 61

Figura 20: Gráfico de *scores* (a) e o gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (50.1%) e na PC2 (47.8%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de *loadings* correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma. 62

Figura 21: Dendograma das amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. 64

Figura 22: Gráfico de *scores* (a) e o gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (50.1%) e na PC2 (47.8%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de

<i>loadings</i> correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma.	65
Figura 23 Típico resultado de análise cromatográfica para três diferentes fragrâncias.....	70
Figura 24: Avaliação de <i>outliers</i> para as medições de a) densidade e b) índice de refração	72
Figura 25: Gráfico a) SEV em função do número de fatores e b) Detecção de <i>outliers</i> através do gráfico Resíduo de <i>Student x Leverage</i> para análise do modelo.	74
Figura 26: Gráfico a) SEV em função do número de fatores e b) Detecção de <i>outliers</i> através do gráfico Resíduo de <i>Student x Leverage</i> para análise do modelo.	76

INTRODUÇÃO

As novas exigências dos consumidores no mercado de limpeza doméstica, que se resume em produtos mais eficazes, de maior praticidade, melhor desempenho e preço acessível, têm alavancado o setor no país, com crescimento tanto no volume produzido quanto em seu faturamento. Em 2006 foram produzidos mais de 2,7 milhões de toneladas de produtos de limpeza gerando um faturamento de aproximadamente 10 bilhões de reais [1].

De acordo com um levantamento divulgado pela ABIPLA, Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Afins, em seu anuário 2007, os produtos de limpeza estão presentes na maioria dos lares brasileiros, independente da classe social. Alguns itens, no entanto, têm maior penetração, como é o caso dos detergentes em pó, que está presente em 99,6% dos domicílios, representando um faturamento de 3,1 bilhões de reais em 2006 [2]. Dentre os componentes que fazem parte desse produto a fragrância possui papel importante nesse resultado. Um estudo feito pelo Grupo Procter & Gamble, na Europa, revelou que 70 % dos consumidores declararam apreciar muito o perfume do processo de lavagem de roupas, 25% acharam que deve ser agradável e cerca de dois terços consideraram o aspecto olfativo na hora da compra do produto, mostrando que muitos consumidores são influenciados diretamente por esse requisito [3].

A fragrância aplicada em produtos dessa natureza apresenta três funções básicas: cobrir o odor da base e o odor dos sólidos dissolvidos na solução de lavagem, transmitir sensação de limpeza e perfumar.

No entanto, a percepção de um perfume depende da presença de moléculas odorizantes, de sua natureza e concentração [4]. Assim, conhecer a interação entre uma fragrância e o produto que se deseja perfumar tem se tornado um elemento fundamental na perfumaria moderna. Como os perfumes de composição conhecida possuem uma grande variedade de compostos voláteis, cada uma com características físico-químicas diferentes, a determinação inequívoca de cada componente da fragrância deve ser bem criteriosa. Com os recentes avanços nas técnicas de extração de compostos voláteis, novos métodos e técnicas estão sendo desenvolvidos e podem ser aplicadas para conhecer melhor o comportamento das fragrâncias [5], auxiliando na criação de novas fórmulas que apresentem melhor desempenho quando aplicado em detergente em pó ou em qualquer outra base que se deseja perfumar.

Outro fator importante nesse segmento é a da qualidade do produto que as indústrias que produzem fragrâncias devem disponibilizar aos seus clientes, sendo que as variáveis sensoriais e físico-químicas dessas misturas odoríferas bem como dos componentes naturais e sintéticos de que compõem as fragrâncias, devem ser comparados com padrões e especificações pré-definidas. Uma grande parte dessas especificações, principalmente às relacionadas à matéria prima, está estabelecida em literatura oficial, como Farmacopéia, International Organization for Standardization (ISO), Associação de Óleos Essenciais e Índex Merck [6].

Compostos considerados mais simples e bem conhecidos são caracterizados normalmente por constantes físicas, como densidade, índice de refração, rotação óptica e ponto de fusão. As vantagens desses parâmetros estão relacionadas à rapidez das análises e a possibilidade de comparação entre diferentes laboratórios, e por isso são indispensáveis. No entanto, para compostos mais complexos que requerem identificação e quantificação, são empregadas técnicas mais sofisticadas, como as cromatográficas e espectroscópicas [7][8].

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- Desenvolver um método empregando micro-extração em fase sólida para quantificação dos componentes de uma fragrância usada em detergente em pó.
- Monitorar a estabilidade da fragrância em detergente em pó após diferentes condições de armazenamento.
- Prever a densidade e o índice de refração das fragrâncias a partir dos dados cromatográficos empregando a calibração multivariada.

CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica

1.1. *Fragrâncias*

1.1.1. Composição química das fragrâncias

Fragrâncias são substâncias orgânicas com características odoríferas relativamente fortes e normalmente agradáveis sendo, portanto usadas em perfumes e produtos perfumados [6]. Após sua formulação apresenta-se como uma complexa mistura homogênea de produtos naturais e sintéticos. A demanda mundial por produtos naturais para fabricação de fragrâncias está entre 20 – 30 %, enquanto para produtos sintéticos varia entre 70 – 80 % [9]. Com relação à quantidade de diferentes compostos disponíveis, esse número supera 3000 ingredientes, em sua maioria líquidos e não cristalinos. Geralmente uma fragrância consiste de uma mistura contendo entre 20 a 200 diferentes compostos [9].

O pré-requisito de uma substância química para realizar um estímulo olfativo é ter uma volatilidade suficiente para se apresentar no ar. Por essa razão a natureza dos grupos funcionais, a estrutura e a massa molar são fatores importantes a serem considerados, pois influenciam a capacidade de difusão dessa substância no ambiente.

Como os compostos apresentam volatilidade diferenciada devido à natureza química, o odor de uma fragrância se modifica durante sua evaporação, por esse motivo pode ser classificadas em nota de topo, nota intermediária ou de corpo e nota de fundo ou nota seca, que consiste basicamente nos períodos de evaporação dos componentes na mistura [6].

1.1.2. Fatores que influenciam a volatilidade de substâncias odorantes

Se uma substância líquida ou sólida pura está em um sistema fechado a uma temperatura controlada e exposta ao ar, certamente vapores do líquido ou sólido serão liberados para o ambiente, o *headspace*. Sua concentração no ar aumenta continuamente até atingir um nível constante, deste modo alcançando um equilíbrio entre as fases. A concentração no ar desta substância é dependente, podendo ser expressa em unidades de pressão (pressão de vapor em *pascal* ou *torricellis*) ou em termos de concentração (concentração no *headspace* em microgramas por litro de ar) e representa uma medida quantitativa para uma substância volátil pura.

Caso a substância não esteja em seu estado puro, sendo parte de uma mistura, como em um óleo essencial ou uma fragrância, ou se o material está dissolvido em uma matriz líquida ou sólida, sua evaporação do estado condensado para a fase vapor não depende somente da pressão de vapor do composto puro, mas também de sua composição na mistura. Para um sistema fechado que apresenta um equilíbrio de distribuição entre as fases, a relação quantitativa pode ser descrita pela lei de *Raoult* (equação 1).

$$p_i = p_i^o x_i \quad (1)$$

onde:

p_i a pressão parcial da substância i no ar acima da mistura,
 p_i^o a pressão de vapor da substância pura,
 x_i sua concentração na mistura líquida em termos de fração molar.

Para sistemas diluídos, por exemplo, solução de uma fragrância em um solvente, a distribuição de fase é melhor descrita pela lei de Henry (equação 2).

$$p_i = Kx_i \quad (2)$$

onde:

K é o coeficiente de partição ar / líquido, ou seja, uma constante em uma determinada temperatura para um dado sistema (soluto / solvente).

Entretanto, ambas as leis são válidas somente para sistemas fechados e com comportamento ideal. Na prática, muitos sistemas representam misturas ou soluções não ideais, devido ao fato que interações físico-químicas tomam lugar entre as moléculas da mistura, no líquido bem como no vapor. Conseqüentemente, a pressão parcial de um dado componente pode ser consideravelmente maior ou menor que o calculado com base nas leis de distribuição citadas acima, se as forças de atração ou repulsão que agem sobre as moléculas de um dado componente em um dado sistema forem predominantes [9].

Para que as leis de distribuição sejam válidas para sistema não-ideal, é necessário introduzir fatores de correção, chamados de coeficientes de atividade e fugacidade. O primeiro está relacionado às interações moleculares no líquido, o segundo na fase vapor. Com esses coeficientes, é possível calcular a composição da fase vapor da fragrância [10]. No entanto, tais fatores não estão disponíveis para amostras reais perfumadas que muitas vezes estão longe de serem misturas homogêneas ou soluções ideais. A presença de partículas sólidas ou gotas devido à separação de fases, a formação de micelas ou simplesmente o fato que uma substância odorante ou uma fragrância é parte de uma matriz sólida, como por

exemplo, base de sabonete ou detergente em pó, pode ter uma grande influência na concentração de um composto no ar. Esses cálculos baseados em distribuição de fases nem sempre dão resultados aproximados, como foi observado por Nobert e Franz em um experimento que avaliaram a concentração de uma mistura de compostos odorantes no *heaspace* após a aplicação em diferentes matrizes ou bases [9]. Outros fatores como a adsorção ou interações moleculares entre os componentes em sistemas não homogêneos podem apresentar um papel adicional e possivelmente dominante [24].

Os vários aspectos de como as substâncias voláteis de aromas dependem fortemente da natureza multi-fase das matrizes de alimentos foram discutidos por Land [11]. Algumas dessas relações podem ser aplicadas a sistemas semelhantes no campo de fragrâncias.

1.2. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (GC) é uma das mais comuns e importantes técnicas analíticas usadas na indústria de fragrâncias [4] [23], visto que ela é idealmente adaptada para compostos voláteis que são à base desse segmento industrial. Permite a separação de misturas complexas facilitando a identificação e quantificação dos componentes individualmente. A técnica de cromatografia a gás é baseada na partição dos analíticos entre a fase móvel (um gás como hélio, hidrogênio ou nitrogênio) e a fase estacionária líquida, que é freqüentemente o recobrimento interno de micro-tubo de sílica fundida. O tempo tomado para um material eluir na coluna, seu tempo de retenção, é reprodutível sob as idênticas condições de operação do cromatógrafo. O tempo de retenção de um composto pode ser um bom guia para sua identificação quando comparado com padrões conhecidos.

A configuração básica de um cromatógrafo a gás pode ser adaptada com uma grande variação de injetores, colunas e detectores específicos para aperfeiçoar a separação de componentes e auxiliar na sua identificação.

1.3. Técnicas de preparo de amostra para análise de fragrâncias

O desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação da composição química de fragrâncias é uma tarefa desafiante, devido à algumas propriedades inerentes a essas amostras, dentre as quais se destacam:

- A concentração de analitos relevantes em amostras perfumadas pode estar em concentrações extremamente baixas.
- Muitas fragrâncias são derivadas de misturas bastante complexas, como os óleos essenciais.
- Alguns compostos possuem limitada estabilidade química, devido à fotólise, oxidação e outras reações.

Como consequência, a caracterização química de fragrâncias normalmente demanda técnicas de amostragem e preparo de amostras, separação do analito, detecção e quantificação [5]. Normalmente uma técnica de separação analítica é utilizada na separação e quantificação. Cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas ou outro esquema similar de detecção são os métodos mais comumente utilizados para análise de fragrâncias [23].

Para a realização das análises das amostras, um isolamento adequado e pré-concentração do analito ativo para o odor são mandatórios e crítico na metodologia para caracterização química de fragrâncias. Para isso, muitas técnicas de extração, como extração líquido-líquido clássico (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração em fluido

supercrítico (SFE), entre outras, tem sido empregada para preparação de amostra na análise de fragrâncias [5].

1.3.1. Métodos Clássicos

1.3.1.1. Extração Direta

A extração com solvente orgânico é um método utilizado para separação de óleos essenciais de matrizes. A extração simples seguida da evaporação do solvente foi um dos primeiros métodos usados para separação de compostos aromáticos. No entanto, os compostos co-extraídos da matriz prejudicam a ampliação do uso da extração direta. Essa técnica pode utilizar solvente puro como, por exemplo, éter etílico, diclorometano, éter de petróleo e ou pentano, quanto misturas. Estes solventes são os mais utilizados por apresentarem como característica baixo ponto de ebulição, possibilitando que os componentes mais sensíveis não sejam degradados com o aquecimento. Outro fator positivo é a seletividade desses solventes que priorizam a remoção das substâncias odoríferas na extração [12].

1.3.1.2. Destilação

As várias técnicas de destilação são normalmente diferenciadas de duas maneiras com uma pequena variação entre elas. No primeiro, método indireto, a matriz para ser extraída é misturada com água em um recipiente adequado fixado a um condensador. A mistura é aquecida até a temperatura de ebulição da água de forma que os voláteis possam ser arrastados pelo vapor que é então condensado separando a água do óleo. Esse método chamado de hidrodestilação é ainda amplamente usado para caracterização de óleos essenciais.

No segundo procedimento, método direto ou arraste a vapor, um recipiente é preenchido com o material a ser extraído e o vapor, que é introduzido na base,

mistura-se com os compostos voláteis, capturando-os. A destilação a vapor é um dos métodos convencionais mais usados para extração de amostras odoríferas e normalmente feita através da aparelhagem de Likens-Nickerson ou suas derivações [5].

Essas técnicas possuem como principal desvantagem a decomposição dos compostos termolábeis.

Os métodos de preparo de amostras à pressão atmosférica podem apresentar sérias desvantagens quando aplicados na caracterização de fragrâncias, uma vez que as temperaturas usualmente necessárias para a operação pode causar a degradação de alguns analitos.

A destilação a vácuo pode minimizar o efeito negativo da temperatura para os compostos termolábeis evitando sua degradação, sendo uma alternativa para os métodos regulares de destilação.

1.3.2. Métodos modernos

As técnicas mais recentes de amostragem de voláteis utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico. Como em outras técnicas, dependem da partição dos analitos da matriz e uma fase extratora que pode ser um gás, um líquido ou um adsorvente [13]. Procedimentos baseados na manipulação do *headspace* em contato com substâncias voláteis são populares e extremamente convenientes para análises químicas de fragrâncias. Diferentes métodos têm sido empregados, como a análise direta do *headspace* ou pela coleta das substâncias usando algum dispositivo como um sorvente ou uma armadilha (*trap*).

1.3.2.1. Amostragem estática do espaço livre – *Headspace* Estático

O *Headspace* Estático tem como princípio o equilíbrio entre a fase líquida e o seu vapor dentro de um recipiente fechado a uma temperatura controlada. Dessa forma um volume pequeno e bem definido é retirado desse espaço livre

através de um septo e analisado diretamente, normalmente por cromatografia gasosa. A simplicidade do método consiste na análise direta da composição química da fragrância contida em uma fração do ar em contato com a matriz emissora do odor, sem nenhuma necessidade de tratamento da amostra. No entanto como nenhuma pré-concentração dos analitos é realizada e considerando os baixos níveis dos componentes em determinadas composições, esse método apresenta como principal desvantagem a diluição da amostra ocasionando uma baixa detectabilidade da análise [14]. Outra característica inadequada é o fato da composição da fase gasosa ser diferente da composição da matriz.

1.3.2.2. Amostragem dinâmica no espaço livre – *Headspace* Dinâmico

No procedimento de amostragem dinâmica no espaço livre, também conhecido como método de purga e captura, um gás inerte é borbulhado na amostra (purga) e os analitos voláteis são carregados para uma armadilha (captura). O equilíbrio entre a amostra e o *headspace* é constantemente alterado, concentrando os voláteis no adsorvente, possibilitando a aplicação a uma grande faixa de compostos. O método pode ser diferenciado pela armadilha utilizada, sendo elas: adsorventes ou criogênicas. As armadilhas criogênicas são aquelas que capturam os compostos em um recipiente refrigerado [15]. Os sólidos adsorventes podem ser desde carvão ativado à sílica gel, todavia os mais utilizados são os polímeros porosos sendo constituídos de poliestireno, ésteres poliacrílicos ou resinas fenólicas. Alguns polímeros, como polidimetilsiloxano e poliacrilato se comportam como solventes, pois se apresentam como líquidos na temperatura de extração. Outros polímeros também têm sido utilizados, como o Tenax (2,6 – paradifenileno) e seus derivados, conhecidos comercialmente por Porapak.

A dessorção dos analitos capturados para subsequente análise pode ser realizado com pequenas quantidades de um solvente adequado [16] ou usando um dispositivo de dessorção térmica automatizada [17]. Embora possa ter uma

demanda mais complexa, um maior custo de manutenção e não ser conveniente para substâncias sensíveis a alta temperatura, o processo de dessorção térmica tem algumas vantagens sobre a dessorção com solvente como, ser um procedimento mais simples, ter melhores limites de detecção e não ter interferência dos picos do solvente nos cromatogramas.

De maneira geral a técnica permite bons rendimentos na recuperação dos compostos voláteis ou através da dessorção térmica, embora possa causar alterações moleculares naqueles compostos mais sensíveis, ou por meio da dessorção com solvente, um método mais suave, mas que pode mascarar ou perder algumas substâncias voláteis. As principais vantagens destacadas para esse método se traduzem na obtenção de um extrato mais limpo, ou seja, contem um menor número de compostos que naqueles obtidos pelo método de extração com solvente ou destilação, possibilidade de injeção direta após a extração com os polímeros adsorventes no cromatógrafo (dessorção térmica) e flexibilidade em acondicionar diferentes amostras ajustando o tamanho do recipiente de acordo com a necessidade.

1.3.2.3. Extração com fluido supercrítico

Conceitualmente o fluido supercrítico é definido como qualquer substância cuja temperatura e pressão estejam acima do ponto crítico, como normalmente é demonstrado em um diagrama de fases cujas propriedades físico-químicas assumem valores intermediários daqueles dos estados líquido e gasoso [18]. Propriedades relacionadas ao poder de solvatação, como a densidade do fluido supercrítico, aproxima-se de um líquido, permitindo maior solubilização do analito de interesse, enquanto as propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como viscosidade e difusividade, atingem valores semelhantes de um gás, auxiliando em uma maior penetração na matriz.

A técnica de extração com fluido supercrítico é relativamente recente e está baseada nas propriedades descritas acima, na qual é possível controlar o poder de solvatação do fluido extrator por meio da variação de pressão e temperatura

acima do ponto crítico. Como as propriedades de transporte de massa são maiores nos fluidos supercríticos, os fluxos de extração são mais rápidos e ocorrem em tempos mais curtos.

Considerando a variedade de fluidos supercríticos disponíveis, o dióxido de carbono é o mais utilizado devido às suas características como inércia química, praticamente atóxico nas condições de uso, não ser inflamável, fácil remoção e purificação [19], custo inferior aos solventes orgânicos, facilmente reciclado após o uso e atinge o estado supercrítico em condições relativamente amenas (31 °C, 73 atm). Uma outra característica é a capacidade de remoção de compostos menos voláteis à temperatura ambiente.

No entanto, o método necessita de um sistema de distribuição de fluido à alta pressão e uma fonte de gás de alta pureza, o que gera um custo elevado quando comparado os outros sistemas de extração. Outra dificuldade da técnica está na extração de analitos com média e alta polaridade.

1.3.2.4. Microextração em Fase Sólida (SPME)

A Microextração em Fase Sólida (SPME – Solid Phase Microextraction) é uma microtécnica em que os processos de extração e pré-concentração do analito ocorrem em uma única etapa. Introduzida por Janusz Pawliszyn em 1990 [20], oferece várias vantagens para o preparo de amostra abrangendo a redução do tempo total de análise por amostra, menor tratamento / manipulação, eliminação dos solventes orgânicos, perda reduzida de analito, simplicidade, baixo custo por amostra, possibilidade de implementação de procedimento analítico automatizado, reuso da fibra, além da possibilidade de manipulação de pequenas quantidades de amostra. Pela característica da fibra ser um amostrador passivo, descarta a necessidade de bombas e controladores de fluxo para amostragem em campo [13][21]. Complementando, a fibra apresenta uma natureza hidrofóbica com pequena capacidade de extração do recobrimento, portanto não há a necessidade de secagem da amostra.

As fibras de SPME consistem em um pedaço de sílica fundida de aproximadamente 1 cm recoberta com uma fase extratora. Essa fibra é exposta a

amostra. O polímero é capaz de extrair alguns compostos presentes na matriz de acordo com sua afinidade pela fibra, separando-os da matriz e concentrando-os. Após esse processo, a fibra é inserida no injetor de um cromatógrafo permitindo a dessorção térmica do analito. O procedimento é rápido, simples e bastante sensível [22]. Para proteção da fibra, ela é montada em um dispositivo semelhante a uma seringa, chamado aplicador ou *holder*.

Uma das principais diferenças entre a SPME e as técnicas convencionais refere-se ao fato das extrações dos analitos não ser exaustiva. A técnica é baseada na distribuição dos analitos na matriz, no seu *headspace* e no recobrimento da fibra.

Há dois tipos básicos de extração por SPME, extração direta e extração através do *headspace*. Na extração direta a fibra é imersa diretamente na amostra onde são extraídos os analitos. No modo *headspace*, os analitos primeiro difundem da amostra para a fase gasosa e posteriormente da fase gasosa para o recobrimento da fibra. Esse método é especialmente indicado para matrizes altamente complexas e que podem danificar a fibra.

As fibras comercialmente disponíveis podem ser divididas em dois diferentes grupos de acordo com o seu recobrimento, podendo ser polímeros líquidos puros como polidimetilsiloxano (PDMS) ou poliacrilato (PA) e filmes mistos contendo polímeros líquidos e partículas sólidas adsorventes como Carboxen-PDMS (CAR-PDMS), divinilbenzeno-PDMS (DVB-PDMS), Carbowax-DVB e divinilbenzeno-Carboxen-PDMS. Os processos de extração envolvidos na SPME são a partição e a absorção e dependem da natureza do recobrimento. Filmes mistos extraem os analitos por adsorção, recobrimentos líquidos extraem pelo processo partição e normalmente são usados para extração no equilíbrio de compostos voláteis.

A natureza química dos analitos determina o tipo de polímero usado na extração, portanto a seleção da fibra é baseada primeiramente na polaridade e volatilidade dos compostos alvo, fornecendo seletividade e eficiência de extração.

A técnica é muito sensível às condições experimentais e qualquer variação que influencie diretamente o coeficiente de distribuição e as velocidades de sorção

pode prejudicar a reprodutibilidade do método. Desta maneira, para manter os resultados reprodutíveis, as diversas variáveis experimentais devem ser monitoradas durante o processo de sorção, incluindo a forma de amostragem (imersão ou *headspace*), volume da amostra, controle de pH ou conteúdo de sal, controle do tempo e temperatura de amostragem. A eficiência da extração em SPME é maximizada quando é atingido o equilíbrio entre a amostra e o recobrimento da fibra. O tempo de equilíbrio é dependente do tipo de analito, amostra, modo de extração e recobrimento da fibra. O tempo de equilíbrio pode ser reduzido não só através de uma agitação eficiente como também pelo aumento da temperatura de extração ou por ambos [13].

A principal vantagem dessa técnica está na habilidade em isolar e concentrar compostos voláteis sem a interferência de outros componentes na matriz, aliado a uma maior seletividade para compostos voláteis e semivoláteis quando comparada à técnica convencional de amostragem estática do *headspace*.

Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura que demonstram a aplicação da técnica de SPME para análise de fragrâncias incorporadas em produtos de higiene pessoal como xampus e sabonetes [41][42], produtos para cuidados domésticos como detergente líquido e amaciante [38] e também para avaliação de alquilbenzenos linear em detergentes líquidos [39]. Há outros exemplos de estudos que avaliaram o impacto da fragrância em embalagens cosméticas [40] e o perfil de evaporação de um perfume na pele humana [41]. No entanto, o número de trabalhos publicados com esse fim é bastante limitado, isso pode ser justificado pelo fato da técnica ser relativamente recente e as pessoas que trabalham com outros métodos de extração de fragrâncias ainda não se convenceram das potencialidades da técnica.

1.4. Métodos Quimiométricos

Diante do desenvolvimento do grande número de técnicas instrumentais para atender diversos segmentos da química, existe uma dependência cada vez

maior dos recursos computacionais e, conseqüentemente um aumento na aquisição de dados que podem oferecer diferentes tipos de informações [25].

Diante desse perfil surgiu a necessidade de uma nova ferramenta que pudesse ajudar na extração de maiores informações desses grandes conjuntos de dados. Para atender essa demanda a quimiometria apresentou-se como uma área interdisciplinar da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos de análise para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos químicos, bem como para extrair o máximo de informações químicas analisando dados químicos [26][27].

Pode-se dizer, portanto que a quimiometria é uma ferramenta que atua nas interfaces da ciência possibilitando uma união entre a química e outras áreas como a matemática e estatística. De acordo com a necessidade do estudo, a quimiometria pode ser dividida em alguns segmentos aplicados como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados, métodos de inteligência artificial, dentre outras [28].

Particularmente, a vantagem da união entre a quimiometria e a cromatografia gasosa deve-se ao fato que a primeira é uma poderosa ferramenta de análise de dados complexos, e a segunda possibilita a aquisição de um grande número de informações em uma única análise.

1.4.1. Análise exploratória de dados

O objetivo inicial de técnicas de agrupamento é apresentar os dados em que objetos com características semelhantes se aproximem em um dado espaço multidimensional, demonstrando terem alguma relação natural entre si; e os objetos de diferentes grupos sejam diferentes uns dos outros [29]. Também é possível observar a presença de amostras anômalas, que não seguem o padrão das demais.

Para realizar as análises exploratórias multivariadas, os dados obtidos sobre as amostras são organizados em planilha, ou seja, em uma matriz, a qual é derivada por n amostras e m variáveis, resultando em uma matriz $n \times m$. Assim, em um conjunto de dados obtidos pela determinação de compostos orgânicos pelo método cromatográfico, as entradas da matriz são as diferentes amostras estudadas e as variáveis são os tempos de retenção que corresponde à área ou concentração dos compostos identificados [30][31].

Com os dados organizados em uma matriz é possível fazer a visualização dos dados originais. Essa etapa pode ajudar a identificar alguma anormalidade, uma análise com algum desvio, como por exemplo, injeção de uma amostra impura no cromatógrafo, utilização de um método de análise diferente dos demais, entre outros.

Um dos requisitos para utilizar métodos estatísticos de análise é a necessidade de amostragem em replicatas para assegurar a representatividade das amostras e diminuir erros que são gerados aleatoriamente.

Usados para demonstrar as semelhanças e diferenças em diferentes tipos de amostras, agrupando-as e classificando-as, os métodos quimiométricos, estão divididos em dois grupos: métodos “supervisionados” e métodos “não supervisionados” de reconhecimento de padrões. [26][27].

Nos métodos supervisionados, as classes das amostras são conhecidas e esse dado é utilizado para a construção do modelo. Nos métodos não supervisionados não é utilizada essa informação, ou seja, não há necessidade de conhecimento prévio das amostras sobre sua classificação. Elas são agrupadas de acordo com os dados de análises adquiridos.

Os métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões podem ser executados por agrupamento hierárquico (HCA, do inglês, Hierarchical Cluster Analysis) ou por análise de componentes principais (PCA, do inglês, Principal Component Analysis). Essas técnicas estão fundamentadas na suposição de que quanto mais semelhantes forem as amostras, mais próximas elas estarão em um espaço multidimensional [26].

Realizada a análise exploratória, o resultado obtido pode ser usado para a construção de modelos de classificação, os quais podem ser empregados para a previsão de amostras desconhecidas. Vários são os métodos de classificação, no qual podemos destacar dois por serem os mais utilizados, o SIMCA (do inglês, Soft Independent Modelling of Class Analogy) e o KNN (do inglês, K-Nearest Neighbor). O método KNN é bastante simples do ponto de vista matemático enquanto que o método SIMCA é bem mais elaborado e sofisticado, no entanto ambos podem apresentar bons resultados.

1.4.1.1. Pré-tratamento dos dados

Antes de desenvolver qualquer método de análise multivariada recomenda-se um pré-tratamento dos dados para eliminar amostras anômalas, minimizar ruídos e interferentes, procurando maximizar ou minimizar o efeito de certas variáveis no processo.

Há várias maneiras de tratamento das amostras antes de encontrar as componentes principais. Para isso pode-se recorrer a ferramentas de pré-tratamentos nas amostras do conjunto de dados, como por exemplo, a 1ª e 2ª derivadas, o alisamento e a normalização, entre outros, sendo que o uso de cada método deve ser avaliado previamente, dependendo do conjunto em questão.

É possível também proceder ao pré-processamento das variáveis que podem ser feitos basicamente de três maneiras: centrando-as na média, escalando-as pela variância ou auto-escalando-as (centralização dos dados na média e posterior escalamento pela variância)[35].

A centralização dos dados na média é convenientemente usada quando todas as variáveis forem medidas em uma mesma unidade, possuindo uma mesma magnitude, como acontece no caso de cromatografia e espectroscopia. Neste tipo de pré-processamento, o centróide da matriz de dados é levado à origem pela subtração de cada elemento da coluna pela média da respectiva coluna (equação 3).

$$X_{ij(cm)} = X_{ij} - \overline{X_j} \quad (3)$$

onde:

$X_{ij(cm)}$ = valor centrado na média para a variável j na amostra i ;

X_{ij} = valor da variável j na amostra i ;

$\overline{X_j}$ = média dos valores das amostras na coluna j .

No escalamento pela variância, cada elemento de dada variável é dividido pelo desvio padrão dessa variável, elevando dessa forma a variância à unidade. Esse tipo de escalamento conduz todos os eixos da coordenada ao mesmo comprimento, dando a cada variável a mesma influência no modelo (equação 4).

$$X_{ij(var)} = \frac{X_{ij}}{S_j} \quad (4)$$

onde:

$X_{ij(var)}$ = valor escalado pela variância para a variável j na amostra i

X_{ij} = valor da variável j na amostra i

S_j = desvio padrão dos valores da variável j

Por último, o auto-escalamento, que é feito pela centralização dos dados na média e posterior escalamento pela variância. As variáveis terão dessa forma média zero e um desvio padrão igual a um. Estes dois últimos métodos são utilizados quando se pretende dar o mesmo peso a todas as variáveis medidas, já que a PCA, por ser um método de quadrados mínimos, faz com que variáveis com alta variância possuam altos pesos (equação 5).

$$X_{ij(as)} = \frac{\overline{X_j}}{S_j} \quad (5)$$

onde:

$X_{ij(as)}$ = valor auto-escalado da variável j para a amostra i

$\overline{X_j}$ = media dos valores das amostras na coluna j

S_j = desvio padrão dos valores da variável j

Determinado o pré-tratamento adequado para o conjunto de dados, inicia-se então a análise exploratória propriamente dita.

1.4.1.2. Agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA)

A análise de agrupamentos hierárquicos é um método de reconhecimento de padrões usado para formar agrupamentos em um conjunto de dados, relacionando amostras ou variáveis de tal forma que os membros de cada grupo apresentem características semelhantes [29]. Como se trata de um método não supervisionado é adequado especialmente para descobrir “padrões” de comportamento.

Nesse método os dados são apresentados de maneira que possa ser demonstrado o agrupamento natural em um espaço bidimensional, que pode ser obtido considerando-se as amostras ou as variáveis. A HCA calcula a distância entre as amostras, sendo que para distâncias menores as amostras são mais semelhantes. O agrupamento de amostras demonstra as similaridades entre as mesmas, enquanto que o agrupamento das variáveis permite a correlação entre elas [26][27].

Os dados são demonstrados sob a forma de uma árvore hierárquica, também conhecida como dendograma, um gráfico que representa a estrutura hierárquica dos dados onde os comprimentos dos ramos das arvores representam graus de similaridade entre os objetos. Considerando que as amostras próximas

entre si no espaço multidimensional são semelhante referente às variáveis consideradas, um índice numérico é calculado para determinação da proximidade entre pares de amostras, ou seja, a distância entre elas. Após essa avaliação, as amostras mais próximas são agrupadas. Depois do agrupamento de todas as amostras, o índice de similaridade entre os grupos é calculado. Para dois grupos de A e B o índice de similaridade, S_{A_B} é definido como (equação 6) [46]:

$$S_{A_B} = 1,0 - (d_{A_B} / d_{\max.}) \quad (6)$$

onde

d_{A_B} - distância entre grupos

$d_{\max.}$ - distância máxima entre dois grupos de conjunto de dados.

Essa escala com os valores das distâncias pode ser normalizada entre os valores de zero e 1,0, ou seja, quando d_{A_B} é igual a $d_{\max.}$ a similaridade entre A e B é zero. Por outro lado, quando se tem duas amostras idênticas, isto é, quando d_{A_B} é igual a zero, a similaridade é 1,0. Com esses dados, as amostras podem ser representadas por um dendograma, em que o comprimento dos ramos varia de zero a 1,0 e correspondem ao grau de similaridade entre os grupos, onde dois ramos distintos da árvore se unem para obter um único grupo no valor correspondente ao índice de similaridade entre dois respectivos grupos [26].

O dendograma resultante permite a visualização das distâncias entre as amostras em que pode ser observado o grau de similaridade existente, facilitando o reconhecimento de grupos em que vários métodos de conexão podem ser utilizados [32].

1.4.1.3. Análise por componentes principais (PCA)

A análise por componentes principais é definida como um método não supervisionado de análise multivariada dos dados, freqüentemente empregada na

análise de dados complexos para auxiliar na observação de tendências ou fenômenos não perceptíveis por simples observações [33][34].

A análise de componentes principais resulta da construção de um conjunto de novos vetores, ortogonais entre si, chamados de componentes principais. Esses novos componentes são combinações lineares das variáveis originais, construídos em ordem decrescente de variância, e, portanto, de quantidade de informação, resultantes do agrupamento das variáveis altamente correlacionadas. Sendo assim, as análises por componentes principais reduzem a dimensionalidade do conjunto de dados original de forma que as informações mais relevantes ficam concentradas nas primeiras componentes e as de menor importância nos últimos. Dessa forma, as primeiras componentes principais são suficientes para descrever o sistema, possibilitando que seja facilmente interpretado [26][27].

A análise por PCA, assim como por HCA, é uma poderosa ferramenta de visualização, em que os resultados são mostrados na forma de gráficos bidimensionais ou tridimensionais, conhecidos como gráficos de *scores* em que as amostras são projetadas nos novos eixos, sendo possível verificar o agrupamento das que são semelhantes entre si e ainda a discriminação em classes. Como não é possível obter informações analisando gráficos multidimensionais de uma só vez, as informações contidas nas componentes principais são demonstradas em gráficos bidimensionais e às vezes tridimensionais. Em um gráfico de *scores* da primeira componente principal versus a segunda, por exemplo, todas as amostras são alojadas no gráfico na forma de pontos de acordo com suas coordenadas nessas componentes. Além disso, a análise dos gráficos construídos pelas primeiras componentes principais é suficiente para extrair as informações sobre o sistema em estudo. Isto se deve ao fato de que as primeiras componentes concentram a maior percentagem de informações relevantes[46].

1.4.1.3.1. Análise dos gráficos de pesos

Quando é observada a distinção entre conjuntos de amostras nas análises por componentes principais, é possível verificar quais foram as variáveis ou

fatores que mais contribuíram para que ocorresse a discriminação. Essa informação é obtida pela análise dos gráficos de *loadings* (pesos), o qual é obtido em conjunto com os gráficos de *scores* e tem por objetivo explicar o resultado desses. Quando uma matriz de dados originais é decomposta pela análise por PCA, resultam duas outras matrizes, a matriz de *scores* e a matriz de *loadings* (pesos), sendo que a matriz original é o produto da matriz de *scores* pela transposta da matriz de *loadings* (equação 7) [26][27].

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{x} \mathbf{P}^T \quad (7)$$

onde:

\mathbf{T} = matriz de *scores*

\mathbf{P}^T = matriz de *loadings*

Os vetores de *scores* descrevem a relação entre as amostras no subespaço do modelo e os vetores de *loadings* descrevem a importância de cada descritor dentro do modelo. A correlação de amostras com valores positivos em uma determinada componente principal no gráfico de *scores*, com variáveis também de valores positivos no gráfico de *loadings* referente à mesma componente principal, significa que tais amostras possuem maiores teores dos compostos representados por essas variáveis. Da mesma forma, as amostras com valores negativos apresentam baixa concentração dos mesmos compostos[26][27][29].

1.4.2. Calibração multivariada

A calibração multivariada tem como objetivo básico relacionar dois blocos de dados (X e Y), onde X (n , m) é o bloco dos dados experimentais contendo as variáveis independentes, representado em suas linhas pelas amostras do conjunto e em suas colunas pelas variáveis medidas e o outro bloco (Y), formado pela (s) variável (eis) dependente (s) [36]. Dessa forma, na calibração multivariada, ao

contrário do que ocorre na univariada, utilizam-se múltiplas respostas para relacionar com a(s) propriedade(s) medida(s) das amostras [26].

Este tipo de calibração tem como principais vantagens o fato de permitir determinações simultâneas de mais de um analito de interesse, permitir determinações mesmo na presença de interferentes e, apresentar uma diminuição do erro estimado no modelo devido ao fato de ser um método que utiliza múltiplas variáveis.

A calibração, de maneira geral, pode ser dividida em duas etapas consecutivas:

- Modelagem: estabelece-se uma relação entre o sinal medido e a propriedade que se deseja quantificar da amostra.

- Validação: assegura que o modelo reflete o comportamento da propriedade mensurada.

Neste trabalho apresentaremos de forma sucinta um dos métodos classificados como de calibração inversa, o de Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS, do inglês, Partial Least Square), que será definido a seguir.

Uma vez construído o modelo, este deve ser validado, ou seja, testado para garantir que os valores obtidos para a variável dependente sejam iguais ou bastante próximos dos experimentais.

A validação pode ser de dois tipos: utilizando um conjunto externo ou por meio da validação cruzada.

No primeiro caso, o conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos, de calibração e de validação. O modelo é construído usando as amostras do conjunto de calibração e depois é validado utilizando o conjunto com as amostras restantes. Os resultados obtidos para a variável dependente nessa etapa são comparados aos valores experimentais, sendo os resíduos calculados. A eficácia do modelo construído é maior quanto menor forem os resíduos encontrados.

O método de Validação Cruzada funciona da seguinte forma: a matriz de dados é dividida em pequenos grupos. Um determinado grupo é então removido da matriz original e esta, agora reduzida, é decomposta normalmente em *scores* e *loadings*, e o modelo de calibração é estabelecido sobre esse novo conjunto. A partir deste, a propriedade das amostras removidas será prevista e os resíduos obtidos entre os valores reais e os estimados são computados. Isso é repetido para todos os pequenos grupos do conjunto de dados [36].

Existem diversas maneiras de dividir a matriz de dados em subgrupos. Se o número de amostras não é grande, a melhor maneira é utilizar a chamada amostra “uma amostra fora por vez”. Nessa, como o próprio nome já diz, todas as amostras são consideradas um subgrupo individualmente. Esse procedimento torna-se bastante trabalhoso para conjuntos muito grandes, com muitas variáveis [37].

Em ambos os casos, os parâmetros comumente utilizados para avaliar a eficácia dos modelos construídos são o PRESS (do inglês, Prediction Residual Error Sum of Squares) e o SECV/SEP (do inglês, Standard Error of Cross Validation / Prediction). A diferença básica destes dois últimos está no fato de o SECV levar em conta o número de componentes principais (fatores) utilizados.

$$PRESS = \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (8)$$

$$SECV = \sqrt{\frac{\sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - k - 1}} \quad (9)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (10)$$

Onde:

\hat{y}_i é o valor previsto para a amostra i utilizando o modelo;

y_i é o valor medido para a amostra i ;

k é o número de fatores utilizado;

n é o número de amostras do conjunto de calibração;

Após a validação, já é possível utilizar o modelo construído na previsão da propriedade modelada em amostras de onde este valor é desconhecido.

1.4.2.1. Mínimos quadrados parciais (PLS)

Um modelo de calibração é uma função matemática que relaciona dois grupos de variáveis, uma delas chamada dependente (\mathbf{Y}) e a outra chamada independente (\mathbf{X}). Um método de regressão multivariado bastante conhecido é o PLS (do inglês, partial least square) e pode ser demonstrado na equação 11.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (11)$$

Onde:

\mathbf{Y} é o vetor que armazena as informações que se deseja correlacionar;

\mathbf{X} é a matriz contendo os cromatogramas das amostras;

\mathbf{b} é o vetor de regressão;

\mathbf{e} é o vetor que representa o erro do modelo.

O método PLS considera a informação contida tanto na matriz \mathbf{X} quanto \mathbf{Y} para a construção do modelo, decompondo ambas em seus componentes principais, que são chamadas de variáveis latentes. O número de variáveis latentes que será utilizado é determinado durante o processo de validação cruzada [28].

O modelo PLS é obtido através de um processo iterativo, no qual se aperfeiçoa ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre os pesos, para a determinação dos *scores*, e o ajuste por uma função linear dos *scores* da matriz **X** aos *scores* da matriz **Y** de modo a minimizar os desvios [28].

O melhor modelo possível é aquele em que se consegue obter as menores matrizes de resíduos nas matrizes, ao mesmo tempo em que se obtém a melhor relação linear entre os *scores* de **X** e **Y**.

CAPÍTULO 2 – Avaliação de fragrância em detergente em pó após diferentes condições de estocagem.

2.1. Introdução

Uma das maiores preocupações no desenvolvimento de uma nova fragrância está relacionada à sua estabilidade quando aplicada a qualquer produto em seu período de validade, pois como discutido anteriormente, são várias as variáveis que podem prejudicar o equilíbrio entre a base e a fragrância. Como há uma demanda por parte das indústrias em geral para redução no tempo do desenvolvimento dos produtos, devido à concorrência entre elas, surge a necessidade de prever em poucas semanas ou meses, as mudanças químicas ou físicas que poderão ocorrer quando esses produtos forem comercializados, sendo estocados nas prateleiras das lojas, na casa do consumidor, ou em qualquer lugar com grandes variações de temperatura e umidade, como pode ocorrer durante o período de um transporte [4]. Essa variação pode ser facilmente verificada avaliando as grandes diferenças ambientais no globo terrestre. Na tentativa de prever o comportamento dos produtos após fabricação, as indústrias de fragrâncias desenvolveram protocolos de testes de estabilidade acelerados, baseando-se na teoria de Arrhenius para fornecer aos clientes informações que auxiliem na identificação do prazo de validade das mercadorias. A teoria define que a cada 10 °C no aumento da temperatura a velocidade de uma reação dobra,

ou seja, 12 meses de uma reação a 20 °C corresponde a 12 semanas a 40 °C, 6 semanas a 50 °C ou 3 semanas a 60 °C. Na prática, as indústrias testam todos os produtos a 0 – 4 °C, 20 ou 25 °C e 37 ou 40 °C por 12 meses como um requisito mínimo para verificação. A avaliação é realizada comparando as amostras armazenadas em maior temperatura contra aquelas estocadas a 0 – 4 °C, que são consideradas os padrões. Uma escala de 0 – 5 ou A – E pode ser utilizada para sinalizar as variações na aparência física ou no odor da amostra, no entanto tal método de avaliação não permite descrever de maneira detalhada qual componente está influenciando de uma forma mais significativa na amostra, uma vez que a avaliação é apenas sensorial [4].

2.2. Objetivo

Diante do contexto de identificar quais compostos podem apresentar maior variação durante um determinado período de estocagem, dois desafios foram propostos para nortear o desenvolvimento do trabalho, sendo eles:

- Desenvolver um método empregando microextração em fase sólida para quantificação dos componentes de uma fragrância em detergente em pó.
- Monitorar a estabilidade de uma fragrância em detergente em pó após diferentes condições de armazenamento.

2.3. Experimental

2.3.1. Materiais

Para análise dos compostos voláteis, foi utilizado um *holder* de SPME para amostragem manual da Supelco (Bellefonte, PA, USA) e quatro fibras comerciais recobertas com 100µm polidimetilsiloxano (PDMS), 65µm polidimetilsiloxano / divinilbenzeno (PDMS / DVB), 65µm carbowax / divinilbenzeno (CW / DVB) e 75µm carboxen / polidimetilsiloxano (CAR / PDMS). Esses materiais foram

adquiridos da Sulpelco. Foram utilizados frascos de vidro de 20 mL com tampa de plástico e septo de silicone / teflon.

2.3.2. Reagentes

O detergente em pó sem perfume (base) foi fornecido pela Quest International (Vinhedo, SP, Brasil). Para composição do perfume foram utilizados os seguintes compostos: manzanate (2-metil pentanoato de etila), tetrahydrolinalol (3,7-dimetiloctan-3-ol), dihydromyrcenol (2,6-dimetil-7-octen-2-ol), tetrahydro geraniol (3,7-dimetil-1-octanol), ethyl benzoate (benzenocarboxilato de etila), styrallyl acetate (acetato de metilbenzila), dimethyl-benzyl-carbinyl acetate (acetato de 1,1-dimetil-2-fenil etila), pivarose (2,2-dimetilpropanoato de 2-feniletila), phenyl ethyl alcohol (2-fenil-1-etanol), ethyl cinnamate (3-fenilpropenoato de etila), alcohol C12 (dodecanol), dimethyl phenyl ethyl carbinol (2-metil-4-fenil-2-butanol), diphenyl oxide (fenoxibenzeno), eugenol (2-metiloxi-4-(2-propenil)-fenol), rosacetone (acetato de 2,2,2-tricloro-1-feniletila), methyl antranilate (2-aminobenzoato de metila), tonalid 2 (1-(5,6,7,8-tetrahidro-3,5,5,6,8,8-hexametil-2-naftil)etan-1-ona), benzophenone (fenilcetona), vanillin (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeido), raspberry ketone (4-(4-hidroxifenil)-2-butanona)). Esses padrões foram fornecidos pela Quest International (Vinhedo, SP, Brasil) e possuem grau de pureza superior a 99%.

2.3.3. Instrumental

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (GC-FID) 6890N, Agilent Technologies (China), equipado com duas colunas conectadas a um injetor split / splitless. A primeira coluna capilar CP-WAX 58 (FFPA) CB (ácido nitrotereftálico quimicamente ligado com polietilenoglicol), 25 m x 0,25 mm x 0,2 µm, Varian (SP, Brasil), foi conectada ao detector de frente (FID_1). A segunda coluna BP1, (100% dimetilpolisiloxano), 25

m x 0,22 mm, 0,25 μ m, SGE (Austrália), foi conectada ao detector de trás do equipamento (FID_2).

Na aquisição e avaliação dos dados foi utilizado o software Chemstation Rev. A.10.01, Agilent Technologies (USA). Para tratamento quimiométrico dos dados foi utilizado o software Pirouette 3.02, Infometrix.

Para condicionamento das amostras durante o período da avaliação de estabilidade foram usadas: geladeira Metalfrio VB50R, Continental, estufas Binder para Controle de Temperatura e Umidade. As amostras foram embaladas em cartuchos de papelão, que reproduzem as embalagens comerciais de detergente em pó com um volume menor de amostra (130g).

2.3.4. Preparo das amostras

2.3.4.1. Criação da Fragrância

A fragrância foi elaborada misturando-se os 20 compostos citados no item 1.3.2 com a massa necessária para que tivessem a mesma concentração na mistura (5 % m/m) obtendo-se o óleo da fragrância sintética. A separação cromatográfica foi otimizada com esta mistura e as condições cromatográficas estão informadas no item 1.3.6.

2.3.4.2. Aplicação do óleo no detergente em pó para otimização das condições de extração por SPME

Foram separadas três amostras de 100 g do detergente em pó sem perfume e incorporado 0,3 % m/m do óleo em cada amostra. Essas amostras foram embaladas nos cartuchos e mantidas em temperatura ambiente por duas semanas para incorporação do perfume à base.

Após esse período, iniciou-se a investigação dos parâmetros que afetam as condições de extração por SPME, como a seleção de fibra, efeito da massa de

amostra, efeito da temperatura, do tempo de pré-equilíbrio e do tempo de adsorção.

2.3.4.3. Aplicação do óleo no detergente em pó para quantificação dos componentes da fragrância.

Para quantificação de cada componente do perfume foi empregado o método de calibração externa. Para isso foram pesados 3,0 g do detergente em pó em um frasco de 20 mL e adicionado determinada quantidade do óleo. Esse procedimento foi repetido usando sempre a mesma quantidade de detergente em pó e variando a massa de óleo. Para extração foram adotados os parâmetros otimizados na etapa anterior.

2.3.4.4. Aplicação do óleo para o estudo de estabilidade após diferentes condições de armazenamento

Para o estudo de estabilidade foram aplicados o óleo em um grupo de 12 amostras, sendo que em cada aplicação foi pesada 130 g do detergente e incorporado 0,3 % m/m do óleo. Após a aplicação a substância foi homogeneizada em sacos de polietileno permanecendo por 24 horas nessa embalagem. Passado esse período, as amostras foram armazenadas em cartuchos. 04 cartuchos foram submetidos à temperatura de 4 °C, na geladeira; 04 foram submetidos à temperatura de 37 °C e umidade relativa 70 %, na estufa de temperatura e umidade controlada; e 04 foram submetidos à temperatura de 45 °C, na estufa de temperatura controlada. Detergentes sem perfume também foram submetidos às mesmas condições de armazenagem.

Decorrido o tempo pré-definido (2, 4, 8 e 12 semanas), um dos cartuchos de cada condição de armazenagem foi separado e analisado pelo cromatógrafo a gás. A avaliação cromatográfica foi realizada pelo método de microextração em fase sólida conforme parâmetros previamente otimizados. Os dados geraram uma

matriz composta por 34 amostras e 197 variáveis. Os dados foram tratados com software Pirouette 3.02.

2.3.5. Condições de extração por SPME

As quatro fibras comercialmente disponíveis, 100 μm PDMS, 65 μm PDMS / DVB, 65 μm CW / DVB e 75 μm CAR / PDMS foram usadas para verificação da capacidade de extração dos compostos em estudo. Antes do uso, as fibras foram recondicionadas por aquecimento no injetor do cromatógrafo a gás a uma temperatura de 200 °C por 1 h para remover os contaminantes.

Todas as extrações foram realizadas no *headspace* da amostra em frasco de vidro de 20 mL. Experimentos variando massa de amostra, temperatura, tempo de equilíbrio e tempo de pré-equilíbrio foram avaliados para encontrar a condição ideal de extração.

2.3.6. Análise cromatográfica

Após a extração, a fibra de SPME foi removida do frasco com amostra e imediatamente inserida no injetor do cromatógrafo a gás onde ocorreu a dessorção térmica a 200 °C, deixando a fibra exposta no injetor por 10 min. As condições de separação foram as seguintes: temperatura inicial do forno 70 °C, aquecimento 10 °C / min até 150 °C e 13 °C / min até a temperatura final 250 °C mantida por 8 minutos, temperatura do injetor e detector foram mantidas 200 °C e 300 °C respectivamente. O hidrogênio, pureza 5,0, White Martins (Osasco, SP, Brasil), foi utilizado como gás de arraste com pressão 15,0 psi e fluxo 3,2 mL / min para coluna 1 e 1,9 mL / min para coluna 2.

O hidrogênio e ar sintético, pureza 5,0, White Martins, foi utilizado no detector de frente com fluxo de 28,7 mL / min para o H₂ e 450,0 mL / min para o ar sintético e no detector de trás 26,8 mL / min para o H₂ e 450,0 mL / min para o ar sintético.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Otimização das condições cromatográficas

A otimização das condições cromatográficas visando a separação de todos os componentes foi avaliada em duas colunas com polaridades distintas e essa avaliação foi possível devido à configuração do cromatógrafo, que possui duas colunas acopladas ao mesmo injetor. A figura 01 mostra o perfil dos cromatogramas obtidos após definição dos principais parâmetros que permitiram uma boa resolução cromatográfica. A identificação de cada pico foi realizada após a injeção do composto puro. Esse processo foi facilitado pelo fato de cada composto apresentar dois picos por análise, ou seja, um pico em cada coluna, em tempos de retenção diferentes. Assim, os compostos com tempos de retenção muito próximo em uma coluna foram separados e identificados pela segunda coluna. A tabela 01 contém o tempo de retenção para todos esses componentes.

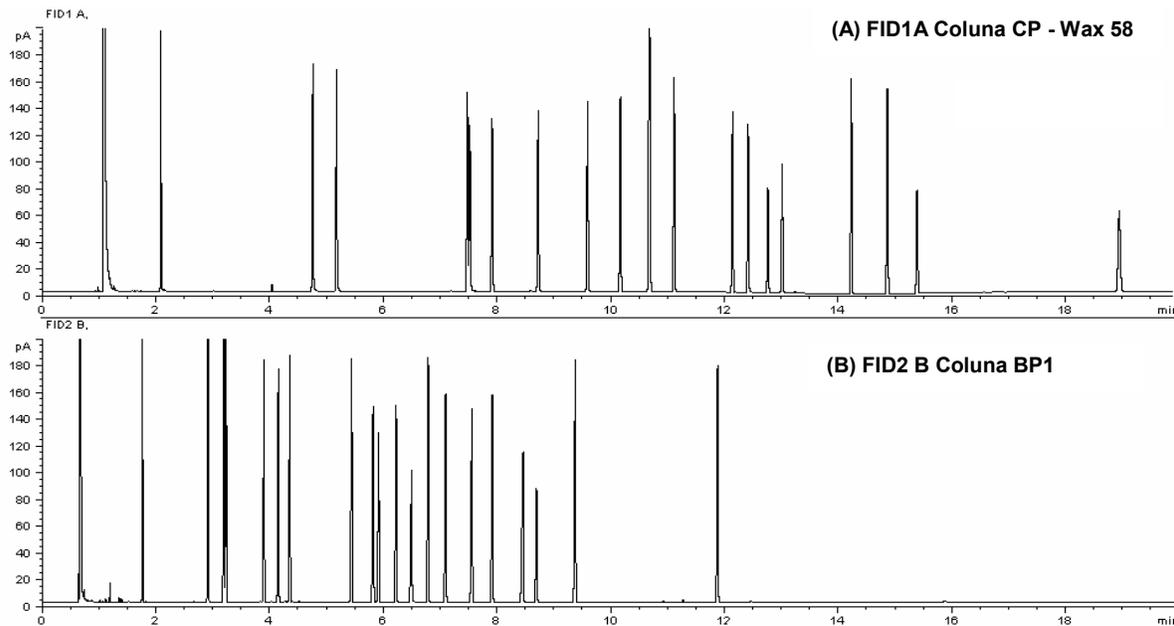


Figura 1: Cromatogramas obtidos da fragrância pura. (A) coluna capilar CP-WAX 58 (FFPA) CB, 25 m x 0,25 mm x 0,2 μ m, temperatura inicial 70 $^{\circ}$ C, aquecimento 10 $^{\circ}$ C / min até 150 $^{\circ}$ C e 13 $^{\circ}$ C / min até a temperatura final 250 $^{\circ}$ C mantida por 8 minutos, temperatura do injetor e detector foram mantidas 200 $^{\circ}$ C e 300 $^{\circ}$ C, hidrogênio com gás de arraste com pressão 15,0 psi e fluxo 3,2 mL / min. (B) coluna capilar BP1, 25 m x 0,22 mm x 0,25 μ m, temperatura inicial 70 $^{\circ}$ C, aquecimento 10 $^{\circ}$ C / min até 150 $^{\circ}$ C e 13 $^{\circ}$ C / min até a temperatura final 250 $^{\circ}$ C mantida por 8 minutos, temperatura do injetor e detector foram mantidas 200 $^{\circ}$ C e 300 $^{\circ}$ C, hidrogênio com gás de arraste com pressão 15,0 psi e fluxo 1,9 mL / min.

Tabela 1: Fórmula molecular dos compostos utilizados na elaboração da fragrância e seu tempo de retenção para as duas colunas.

Descrição	Fórmula Molecular	t_R FID_1	t_R FID_2
Manzanate	$C_8H_{16}O_2$	2,08	1,75
Tetrahydro Linalol	$C_{10}H_{22}O$	4,75	3,22
Dihydro Myrcenol	$C_{10}H_{20}O$	5,17	2,91
Tetrahydro Geraniol	$C_{10}H_{22}O$	7,47	4,34
Ethyl Benzoate	$C_9H_{10}O_2$	7,51	3,89
Styrallyl Acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	7,90	4,14
Dimethyl Benzyl Carbinyl Acetate	$C_{12}H_{16}O_2$	8,71	5,81

Pivarose	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	9,58	7,08
Phenyl Ethyl Alcohol	C ₈ H ₁₀ O	10,16	3,19
Alcohol C12	C ₁₂ H ₂₆ O	10,67	7,91
Dimethyl Phenyl Ethyl Carbinol	C ₁₁ H ₁₆ O	10,67	5,43
Diphenyl Oxide	C ₁₂ H ₁₀ O	11,11	6,78
Ethyl Cinnamate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	12,13	7,55
Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	12,41	6,22
Rosacetone	C ₁₀ H ₉ Cl ₃ O ₂	12,75	8,68
Methyl Anthranilate	C ₈ H ₉ NO ₂	13,01	5,91
Tonalid 2	C ₁₈ H ₂₆ O	14,22	11,87
Benzophenone	C ₁₃ H ₁₀ O	14,86	9,37
Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	15,38	6,49
Raspberry Ketone	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	18,93	8,45

Com base nos cromatogramas observou-se que o tempo de análise para a coluna capilar BP1 foi menor e a resolução foi mais adequada, uma vez que apenas dois compostos não separaram completamente. Já na coluna CP-WAX o número de componentes que não apresentaram completa separação foram quatro. Outra vantagem da coluna BP1 foi o sinal mais intenso para todos os picos. Portanto, a coluna BP1 mostrou as melhores condições para a separação dos compostos da fragrância e foi a coluna escolhida para o monitoramento da otimização da metodologia de extração.

2.4.2. Otimização da metodologia de extração por HS-SPME-GC-FID

Essa etapa do trabalho teve importância fundamental, pois as condições estabelecidas nesse processo foram usadas para quantificação e monitoramento da estabilidade das amostras. A inserção da fibra no frasco da amostra poderia ser no *headspace* ou diretamente na matriz da amostra. O modo *headspace* foi escolhido para evitar degradação da fibra que poderia ser causada pelos componentes da base do detergente em pó.

2.4.2.1. Seleção de Fibra

A seleção das fibras deve ser baseada inicialmente nas características de polaridade e volatilidade dos analitos de interesse. No entanto, nos casos em que se encontra um grande número de analitos, com propriedades físicas e químicas diferentes, a avaliação de diferentes fibras é importante para conhecer qual fibra possui maior afinidade com os analitos.

Quatro tipos de fibras foram avaliados nesse trabalho. Nas figuras 02 e 03 pode-se verificar que as fibras que apresentaram melhor desempenho foram as de PDMS e de PDMS / DVB. Todas as extrações foram realizadas a temperatura de 80°C, 5 minutos para pré-equilíbrio e 5 minutos de equilíbrio.

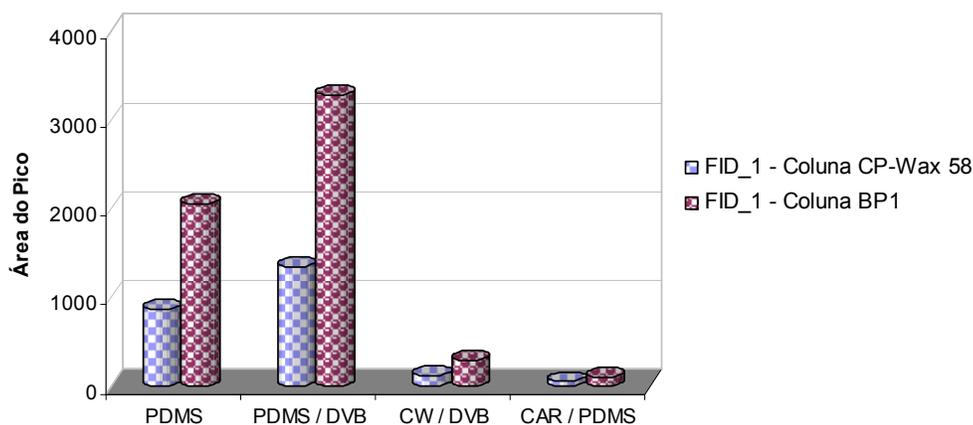


Figura 2: Área total dos picos da fragrância para as quatro fibras. PDMS (100 μ m polidimetilsiloxano); PDMS / DVB (65 μ m polidimetilsiloxano / divinilbenzeno); CW / DVB (65 μ m carbowax / divinilbenzeno) e CAR / PDMS (75 μ m carboxen / polidimetilsiloxano).

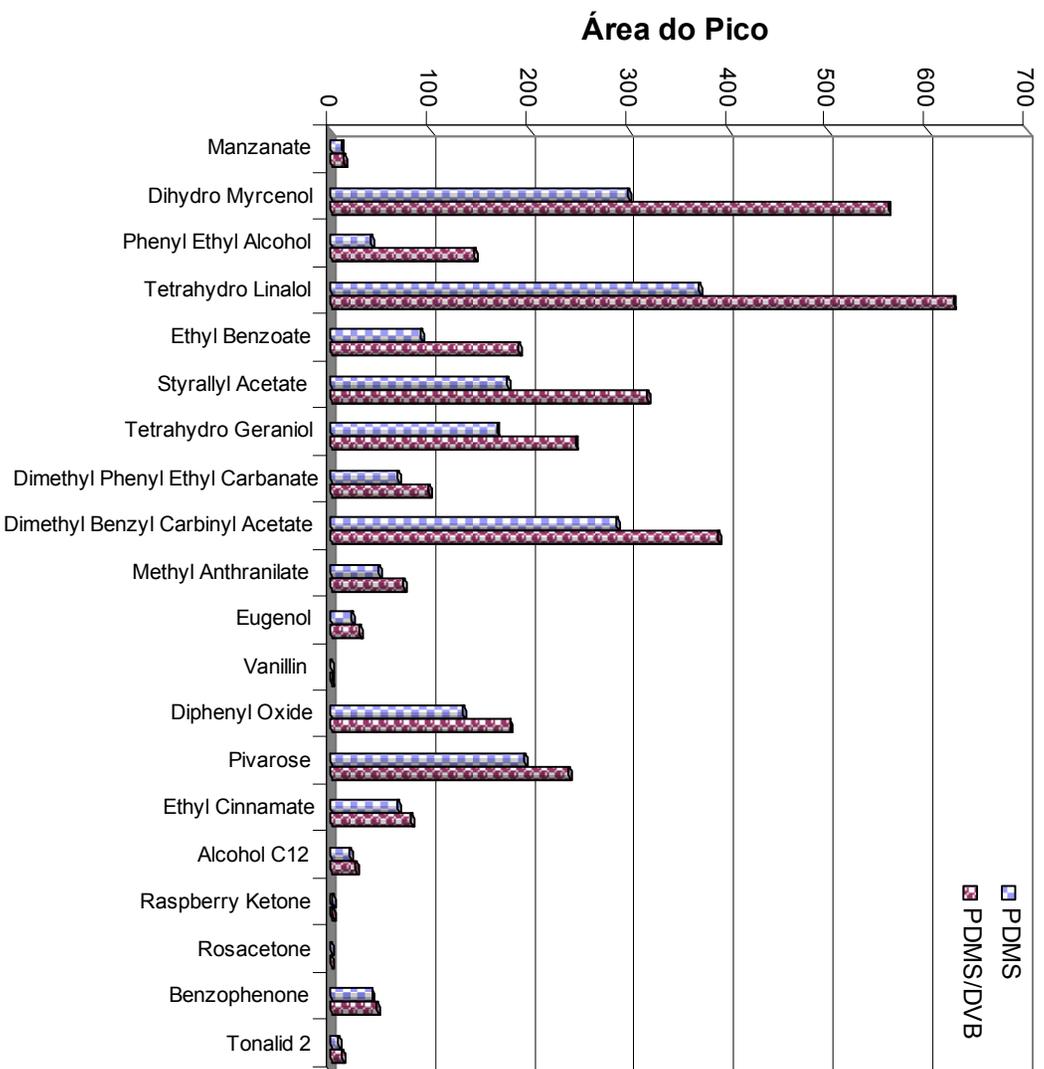


Figura 3: Extração de cada componente pelas fibras PDMS / DVB e PDMS empregando a coluna BP1 (FID_2).

2.4.2.2. Quantidade de amostra

A quantidade de amostra utilizada para extração é importante, pois pode ocorrer tanto a competição entre os analitos pelos sítios ativos da fibra quanto sua saturação. No caso específico de amostras de detergente em pó uma maior quantidade de amostra colocada no interior do frasco melhorou a reprodutibilidade entre as análises.

Conforme mostrado na figura 4, a massa de amostra com maior quantidade de analito extraída foi 3,0 g. Não foi possível aumentar mais a quantidade devido ao volume do frasco empregado que dificultaria a extração no *headspace*.

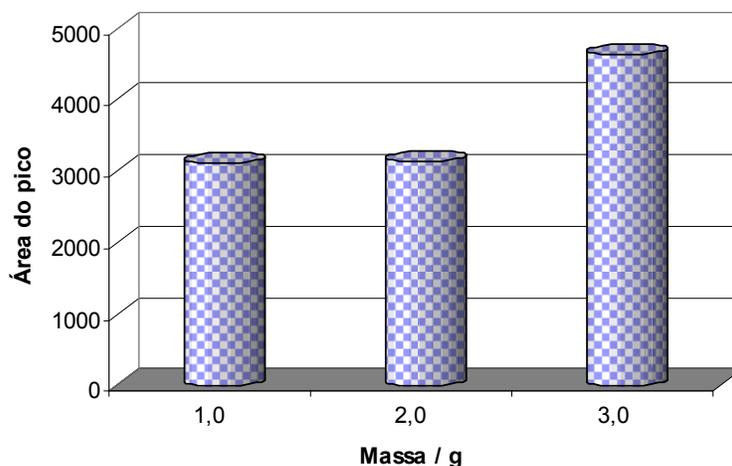


Figura 4: Área de todos os picos referente ao perfume em função da quantidade de amostra colocada no frasco empregando a coluna BP1 (FID_2).

2.4.2.3. Efeito da temperatura

Foi testada a eficiência da extração do perfume no *headspace* em função da temperatura. Para avaliação, foi utilizada uma faixa de temperatura de 40 a 90 °C com a fibra PDMS / DVB. O tempo adotado para o pré-equilíbrio e equilíbrio foi de 5 minutos.

Na figura 5, é possível constatar que a melhor temperatura de extração foi de 80 °C, pois temperaturas maiores não mostraram vantagens em relação à quantidade extraída.

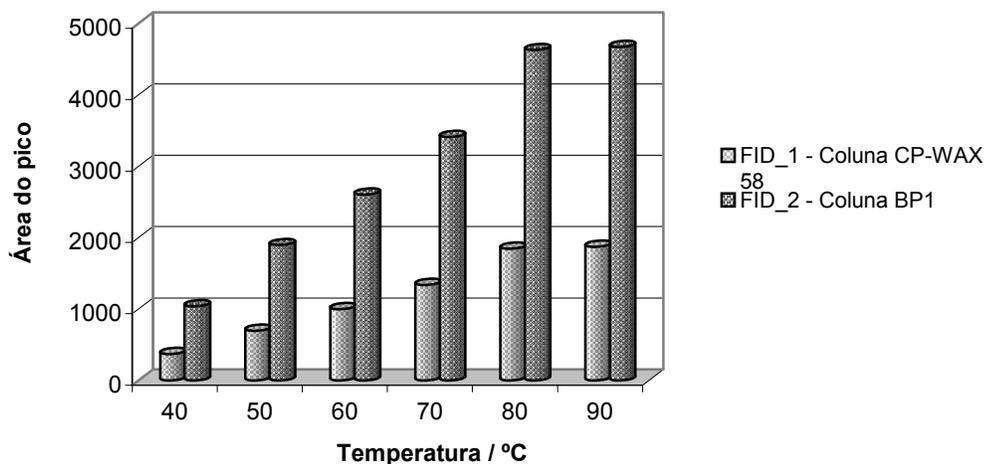


Figura 5: Efeito da temperatura na extração dos componentes da fragrância.

Na figura 06, pode-se observar com mais detalhes o perfil de extração de cada composto e constatar que alguns compostos melhoraram a resposta com o aumento da temperatura de 80 para 90 °C, e outros diminuíram com essa variação.

Temperatura de extração semelhante pode ser encontrada no trabalho publicado por Bothe *et al.* desenvolveram um método de determinação de fragrância em diferentes matrizes como, detergente líquido, amaciante e cera de vela. A temperatura ótima que encontraram para extração com a fibra PDMS foi de 80 °C [38].

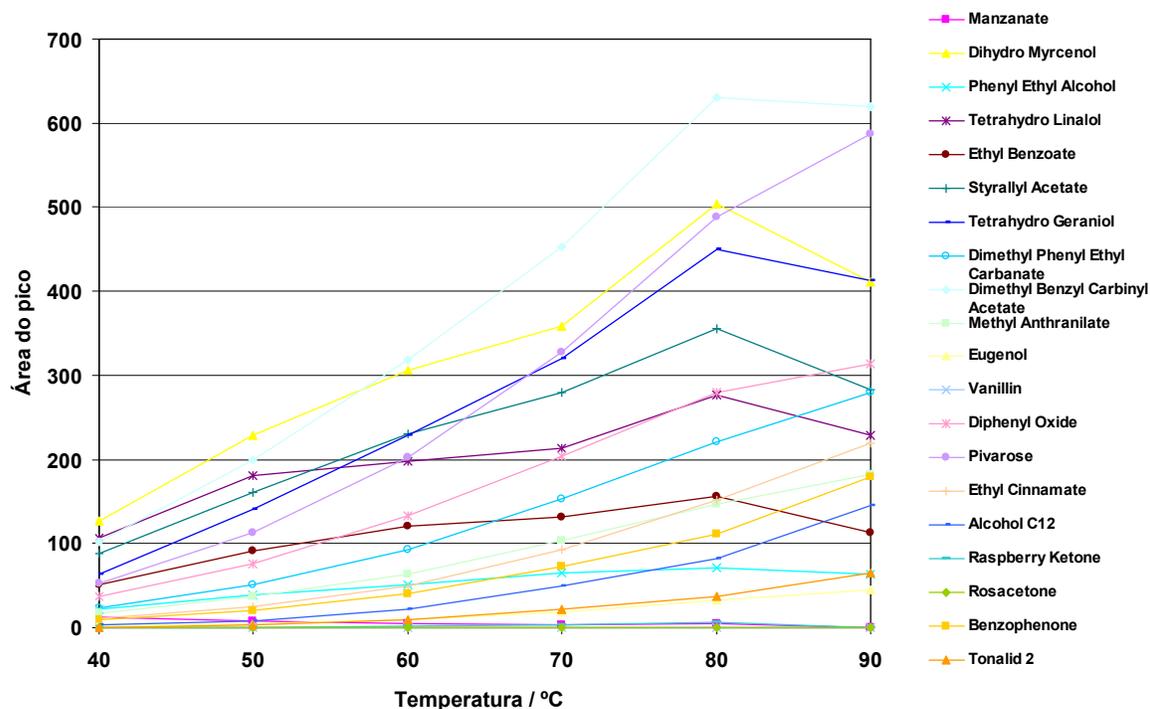


Figura 6: Resposta na extração de cada componente em função da temperatura empregando a coluna BP1 - FID_1.

2.4.2.4. Efeito do tempo de pré-equilíbrio

Esse parâmetro foi avaliado para identificar qual a influencia do pré-equilíbrio na extração, que é o tempo em que a amostra fica no interior do frasco fechado antes da exposição da fibra. O tempo considerado mais adequado foi de 10 min, pois após esse período não foi observado aumento considerável na variação da quantidade extraída conforme evidenciado na figura 07.

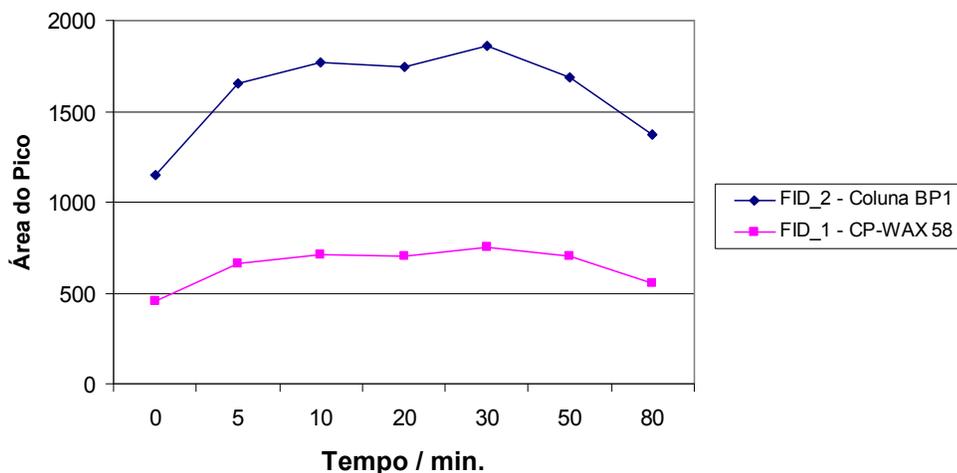


Figura 7: Área total dos picos da fragrância obtidas nos detectores FID_1 e FID_2 em função do tempo de pré - equilíbrio.

2.4.2.5. Efeito do tempo de adsorção

Uma condição considerada ótima para extração por SPME é quando a concentração do analito na amostra e na superfície da fibra está em equilíbrio. Para determinação do tempo de equilíbrio de adsorção foi variado o tempo de 5 a 60 minutos. O perfil de adsorção pode ser visto para todos os picos na figura 08 e para cada componente na figura 09.

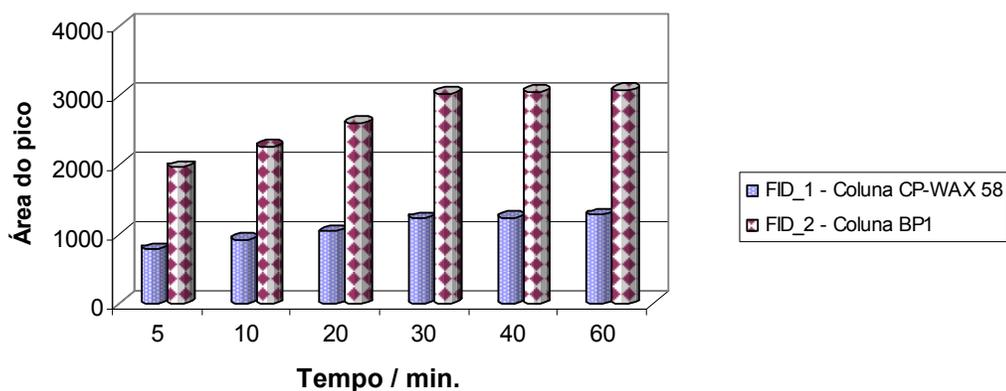


Figura 8: Resposta dos picos relacionados à fragrância nos dois detectores, FID_1 e FID_2, em função do tempo de adsorção.

Considerando os resultados mostrados na figura 08 e o comportamento de cada substância da fragrância na Figura 09, foi definido o tempo de equilíbrio em 30 min, embora esta condição não tenha sido alcançada para todos os analitos, como por exemplo, o Tonalid 2 e Benzophenone.

Após esses estudos, as condições consideradas mais adequadas para a extração da fragrância foram: Fibra PDMS / DVB, quantidade de amostra 3,0g, temperatura 80°C, tempo de pré-equilíbrio 10 min e tempo de adsorção 30 min.

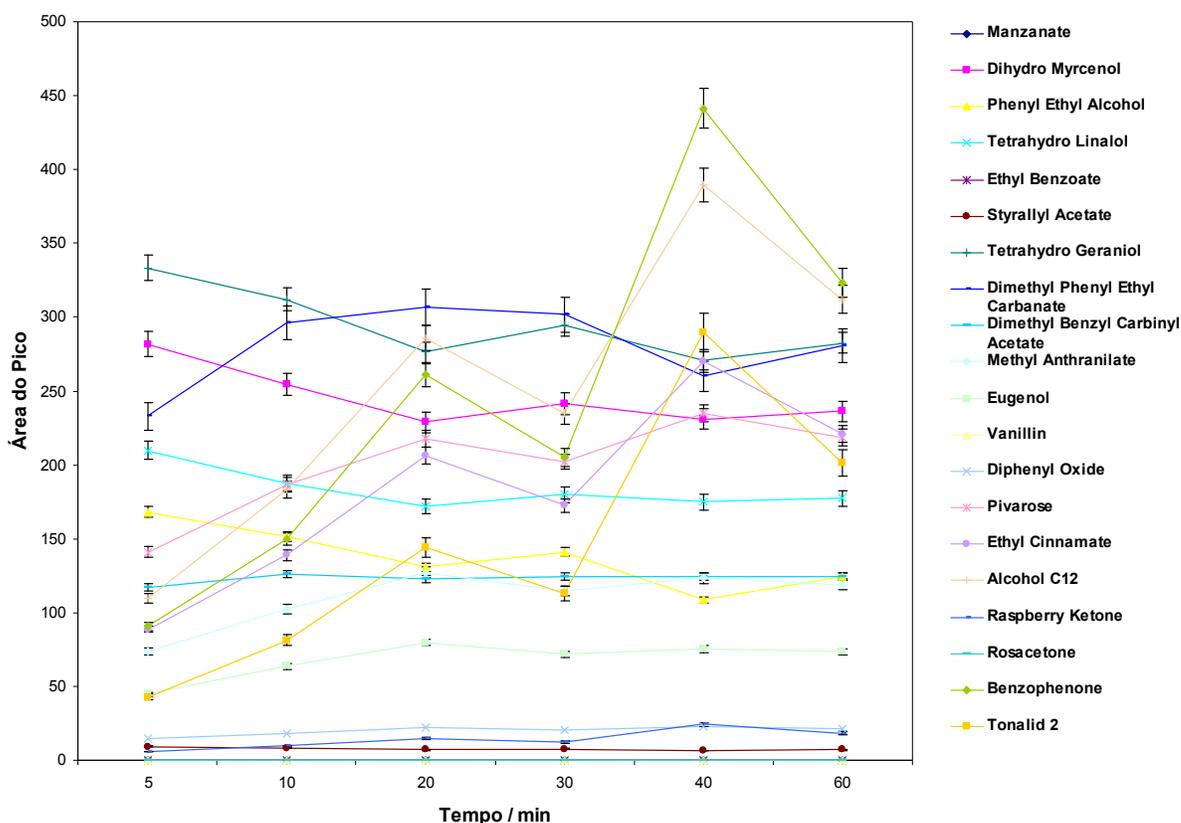
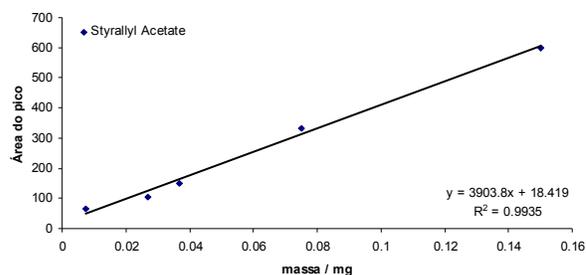
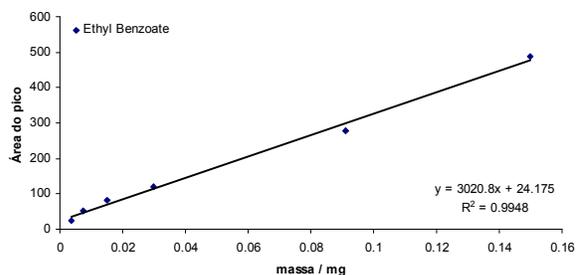
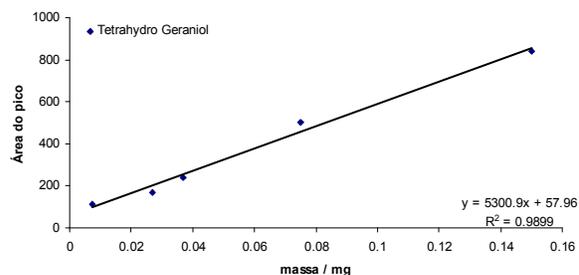
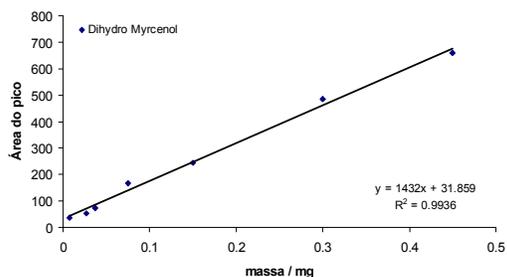
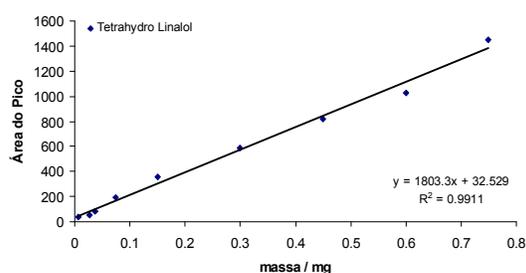
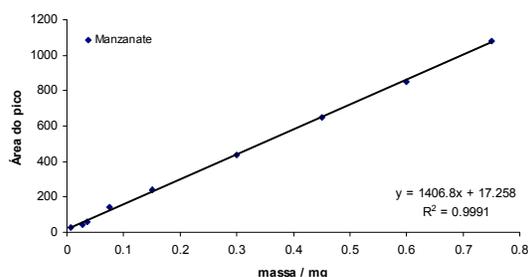


Figura 9: Perfil de extração para cada componente em função do tempo de equilíbrio. Resposta obtida com a coluna BP1 detector FID_2.

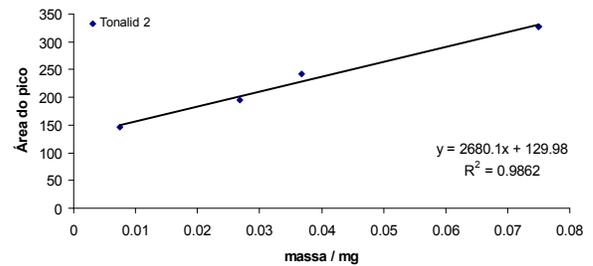
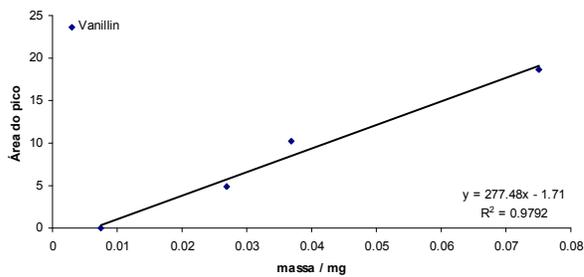
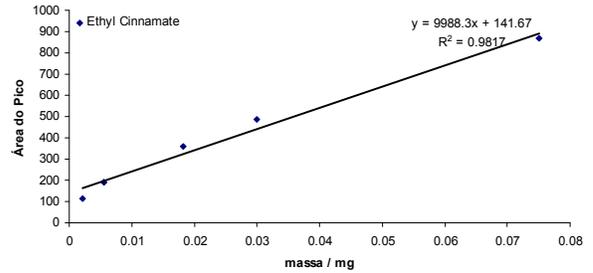
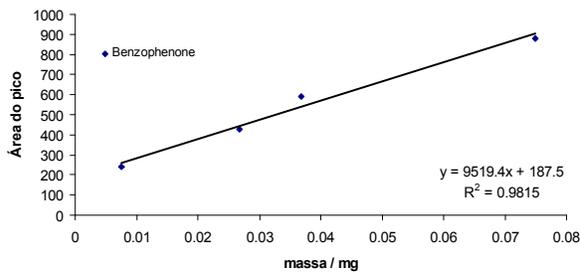
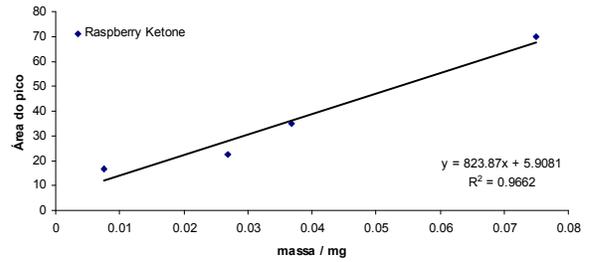
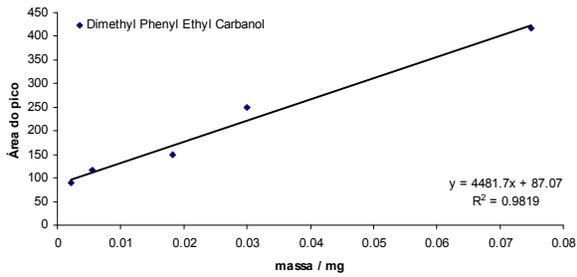
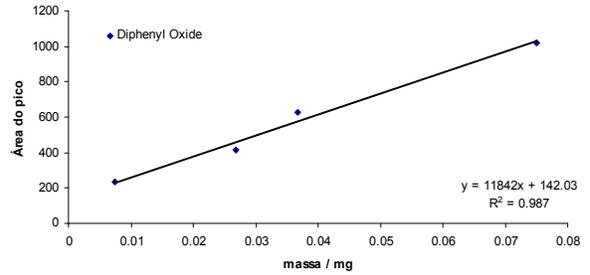
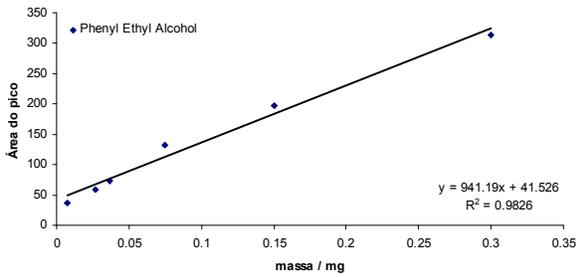
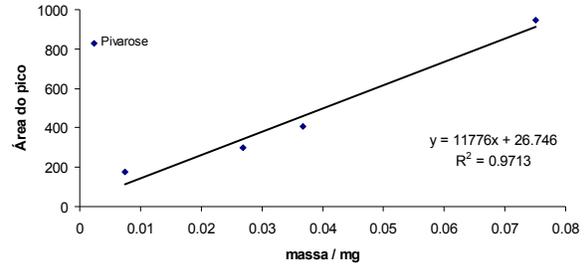
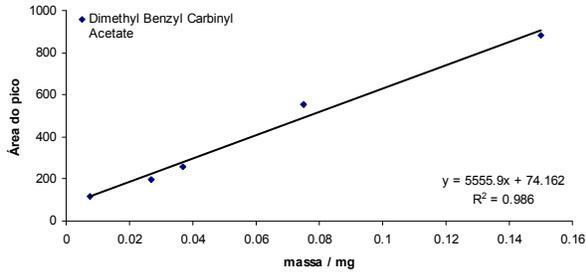
2.4.3. Quantificação dos componentes da fragrância no detergente em pó.

2.4.3.1. Curva analítica

Para obtenção das curvas analíticas, em uma mesma quantidade de detergente em pó, foram adicionadas quantidades diferentes de fragrâncias. As curvas obtidas podem ser vistas na figura 10.



CAPÍTULO 2 – Avaliação de fragrância em detergente em pó após diferentes condições de estocagem.



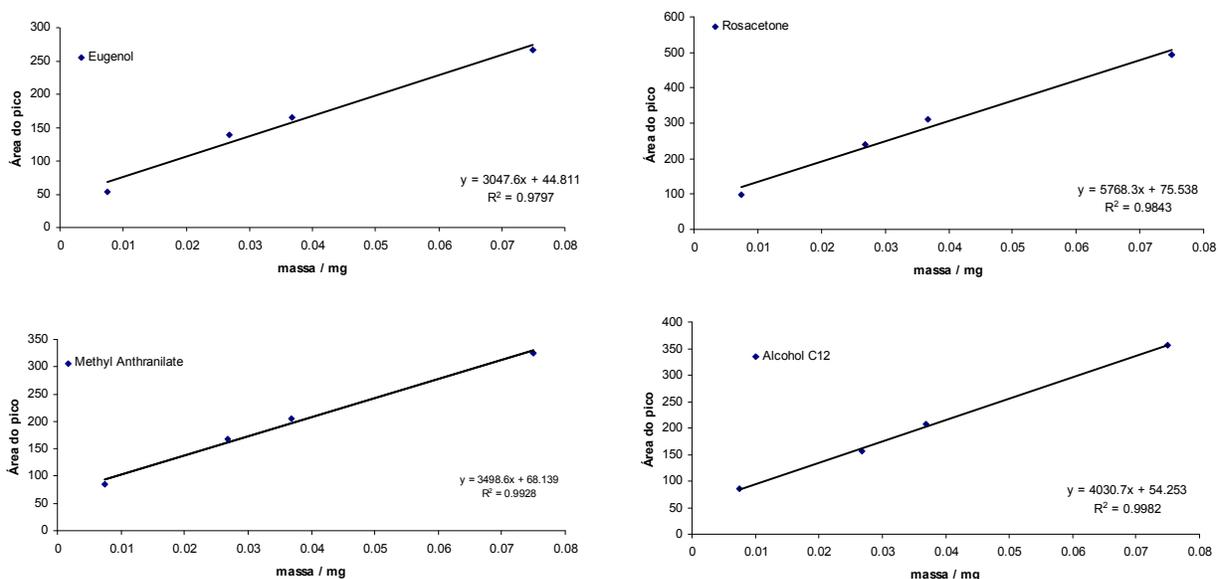


Figura 10: Curvas analíticas para os diferentes componentes da fragrância empregando as colunas CP-WAX 58 e a BP1

Os dados calculados a partir das curvas analíticas como coeficientes de correlação, inclinações, interceptos e limites de quantificação estão informados na tabela 2.

O limite de quantificação do instrumento foi determinado baseando-se na relação sinal / ruído de cada composto. Várias soluções alcoólicas foram preparadas em ordem decrescente de concentração para avaliação de qual era a menor concentração possível para ser quantificada, ou seja, a resposta do composto no cromatograma foi 10 vezes maior que amplitude do ruído [47][47]. Os resultados encontrados podem ser avaliados na tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros obtidos através das curvas analíticas. (a: inclinação da curva, b: intercepto, r: fator de correlação, LQ: limite de quantificação do instrumento).

COMPOSTO	Intervalo linear (mg)	a	b	r	LQ (mg)
Manzanate	0,0075 – 0,7500	1406,8	17,3	0.9995	0,00053
Tetrahydro Linalol	0,0075 – 0,7500	1803,3	32,5	0.9955	0,00122
Dihydro Myrcenol	0,0075 – 0,4500	1432,0	31,9	0.9968	0,00127
Tetrahydro Geraniol	0,0075 – 0,1500	5300,9	58,0	0.9949	0,00292
Ethyl Benzoate	0,0037 – 0,1500	3020,8	24,2	0.9974	0,00180
Styrallyl Acetate	0,0075 – 0,1500	3903,8	18,4	0.9967	0,00160
Dimethyl Benzyl Carbinyl Acetate	0,0075 – 0,1500	5555,9	74,2	0.9930	0,00126
Pivarose	0,0075 – 0,0750	11776,0	26,7	0.9855	0,00119
Phenyl Ethyl Alcohol	0,0075 – 0,3000	941,2	41,5	0.9913	0,00255
Alcohol C12	0,0075 – 0,0750	4030,7	54,3	0.9991	0,00164
Dimethyl Phenyl Ethyl Carbanol	0,0022 – 0,0750	4481,7	87,1	0.9909	0,00356
Diphenyl Oxide	0,0075 – 0,0750	11842,0	142,0	0.9935	0,00171
Ethyl Cinnamate	0,0022 – 0,0750	9988,3	141,7	0.9908	0,00227
Eugenol	0,0075 – 0,0750	3047,6	44,8	0.9898	0,00265
Rosacetone	0,0075 – 0,7500	5768,3	75,6	0.9921	0,00582
Methyl Anthranilate	0,0075 – 0,0750	3498,6	68,1	0.9964	0,00201
Tonalid 2	0,0075 – 0,0750	2680,1	130,0	0.9931	0,00117
Benzophenone	0,0075 – 0,0750	9519,4	187,5	0.9907	0,00127
Vanillin	0,0075 – 0,0750	277,5	-1,7	0.9895	0,00405
Raspberry Ketone	0,0075 – 0,0750	823,9	5,9	0.9830	0,00002

2.4.3.2. Monitoramento de cada componente da fragrância após os períodos de armazenagem.

Decorrido os períodos pré-definidos de 2, 4, 8 e 12 semanas, as amostras de detergente em pó com a fragrância adicionada foram avaliadas cromatograficamente.

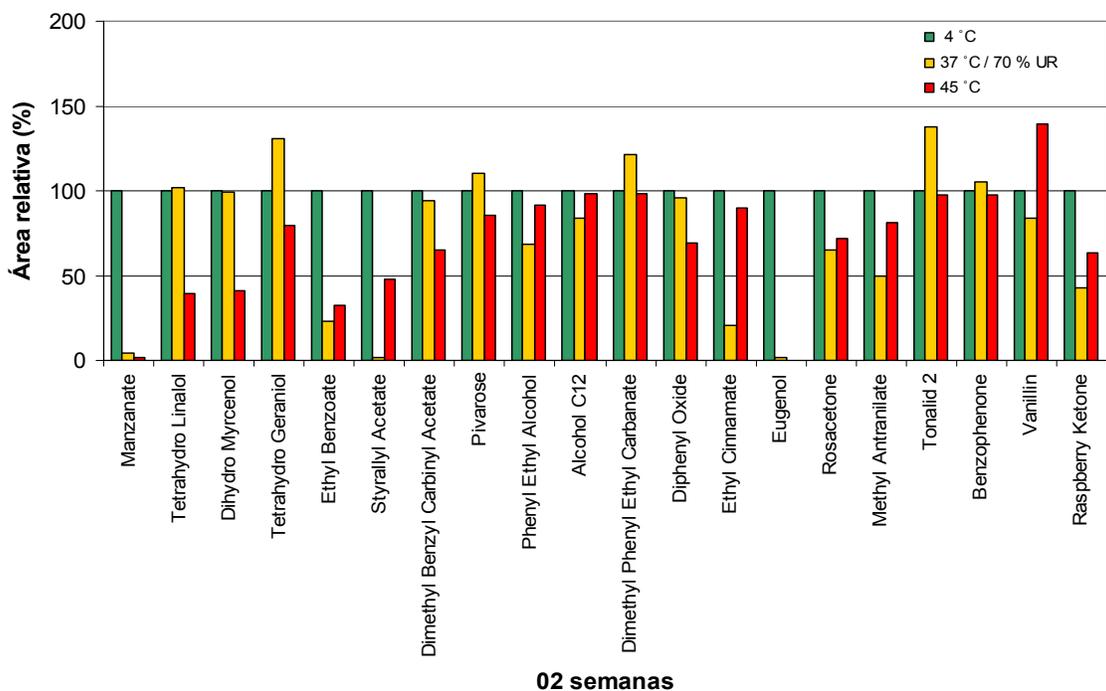
A concentração de cada um dos compostos da fragrância foi calculada a partir das curvas analíticas após o período pré-definido de armazenagem do detergente em pó conforme evidenciado na Tabela 3. Alguns valores estão expressos como “NQ”, não quantificável, ou seja, o resultado obtido está abaixo do limite de quantificação do método. Estes resultados também podem ser visualizados nos gráficos da figura 11, sendo que cada gráfico representa a

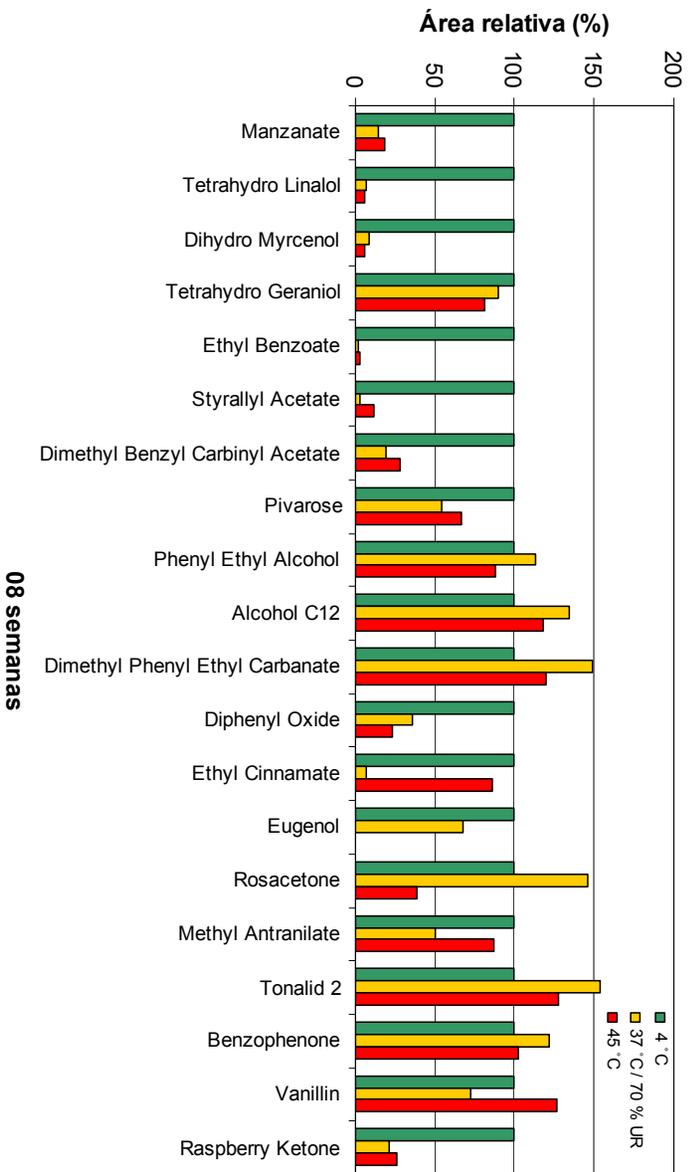
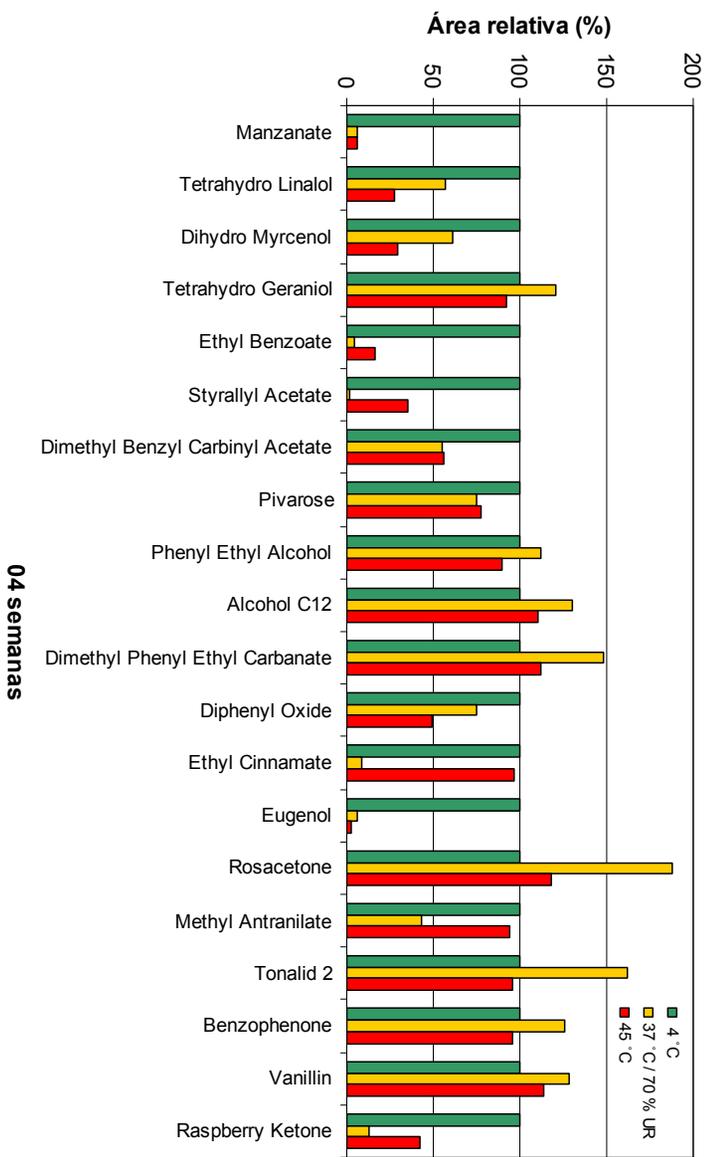
variação obtida dos compostos em relação à condição considerada referência, que foi definida como a armazenagem a 4 °C.

Tabela 3: Concentração dos componentes das fragrâncias após diferentes períodos e condições de armazenamento.

Composto	4 °C	37 °C / 70 % UR		4 °C	37 °C / 70 % UR		4 °C	37 °C / 70 % UR		4 °C	37 °C / 70 % UR	
		45 °C		45 °C	45 °C		45 °C	45 °C		45 °C	45 °C	
	2ª semana (mg)			4ª semana (mg)			8ª semana (mg)			12ª semana (mg)		
Manzanate	0.06	NQ	NQ	0.01	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Tetrahydro Linalol	0.24	0.24	0.08	0.20	0.11	0.04	0.21	NQ	NQ	0.22	NQ	NQ
Dihydro Myrcenol	0.23	0.23	0.08	0.20	0.11	0.04	0.21	NQ	NQ	0.22	NQ	NQ
Tetrahydro Geraniol	0.04	0.05	NQ	0.04	0.05	0.03	0.04	0.03	NQ	0.04	0.04	0.03
Ethyl Benzoate	0.17	0.03	0.05	0.14	NQ	NQ	0.14	NQ	NQ	0.13	NQ	NQ
Styrallyl Acetate	0.15	NQ	0.07	0.12	NQ	0.04	0.12	NQ	NQ	0.10	NQ	NQ
Dimethyl Benzyl Carbiny Acetate	0.15	0.14	0.09	0.13	0.07	0.07	0.14	0.02	0.03	0.14	0.01	0.02
Pivarose	0.09	0.10	0.08	0.08	0.06	0.06	0.09	0.05	0.06	0.08	0.04	0.05
Phenyl Ethyl Alcohol	0.10	0.06	0.09	0.11	0.13	0.09	0.11	0.13	0.09	0.13	0.12	0.07
Alcohol C12	0.05	0.04	0.05	0.05	0.07	0.06	0.06	0.09	0.07	0.06	0.06	0.07
Dimethyl Phenyl Ethyl Carbanate	NQ	NQ	NQ	NQ	0.04	NQ	NQ	0.04	NQ	NQ	0.05	0.04
Diphenyl Oxide	0.09	0.08	0.06	0.08	0.06	0.03	0.09	0.03	NQ	0.09	0.02	NQ
Ethyl Cinnamate	0.04	NQ	0.04	0.04	NQ	0.04	0.04	NQ	0.04	0.04	NQ	0.04
Eugenol	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Rosacetone	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Methyl Antranilate	0.04	NQ	0.03	0.03	NQ	0.03	0.03	NQ	0.02	0.03	NQ	NQ
Tonalid 2	0.01	0.04	0.01	0.05	0.10	0.04	0.02	0.05	0.03	0.03	0.06	0.05
Benzophenone	0.04	0.04	0.04	0.05	0.07	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
Vanillin	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Raspberry Ketone	0.02	0.00	0.01	0.02	NQ	0.00	0.01	NQ	NQ	0.01	NQ	NQ

NQ = não quantificável





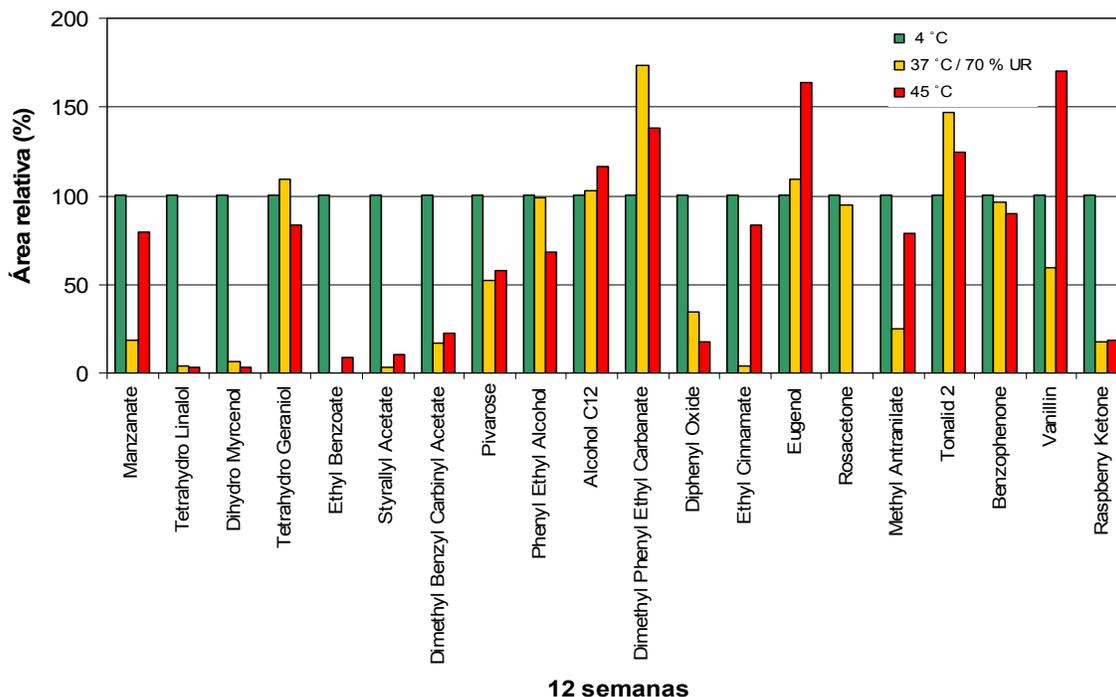


Figura 11: Variação percentual da área do pico cromatográfico dos compostos da fragrância em cada situação de armazenagem. Os dados foram calculados considerando a amostra a 4 °C como referência.

Com esses dados é possível avaliar como as fragrâncias se comportam com o tempo. Não é possível estabelecer uma regra geral para a variação de todos os compostos, uma vez que há vários parâmetros que influenciam na evaporação de uma fragrância, desde a volatilidade de cada componente, interação entre as moléculas da própria fragrância e principalmente interações físicas com a base. Mas conforme descrito no item 1.1.1, fragrâncias possuem notas de topo, notas intermediárias e notas de fundo e essa definição é uma tentativa de demonstrar os diferentes estágios de evaporação em uma fragrância. Pode-se verificar nos gráficos que compostos com maior volatilidade normalmente são evaporados nas primeiras semanas, já compostos com baixa pressão de vapor demoram mais para se desprender da base. Isso explica porque em alguns

casos há compostos com mais de 100 % quando comparado com a amostra padrão, geladeira e indica que em uma determinada condição há uma maior evaporação do composto quando submetido a 45 °C, do que se estivesse na geladeira.

Na figura 12 está ilustrada a variação dos compostos no transcorrer do período em que as amostras foram submetidas à diferentes condições de temperatura e umidade. Alguns componentes de acordo com a condição de estocagem apresentaram redução com o tempo, outros permaneceram relativamente constantes no período, no entanto, devido à grande quantidade de informações disponíveis é difícil uma rápida interpretação que auxilie no desenvolvimento de novas fragrâncias para essa base.

Para facilitar as informações processadas, os dados foram tratados com métodos quimiométricos que serão discutidos a seguir.

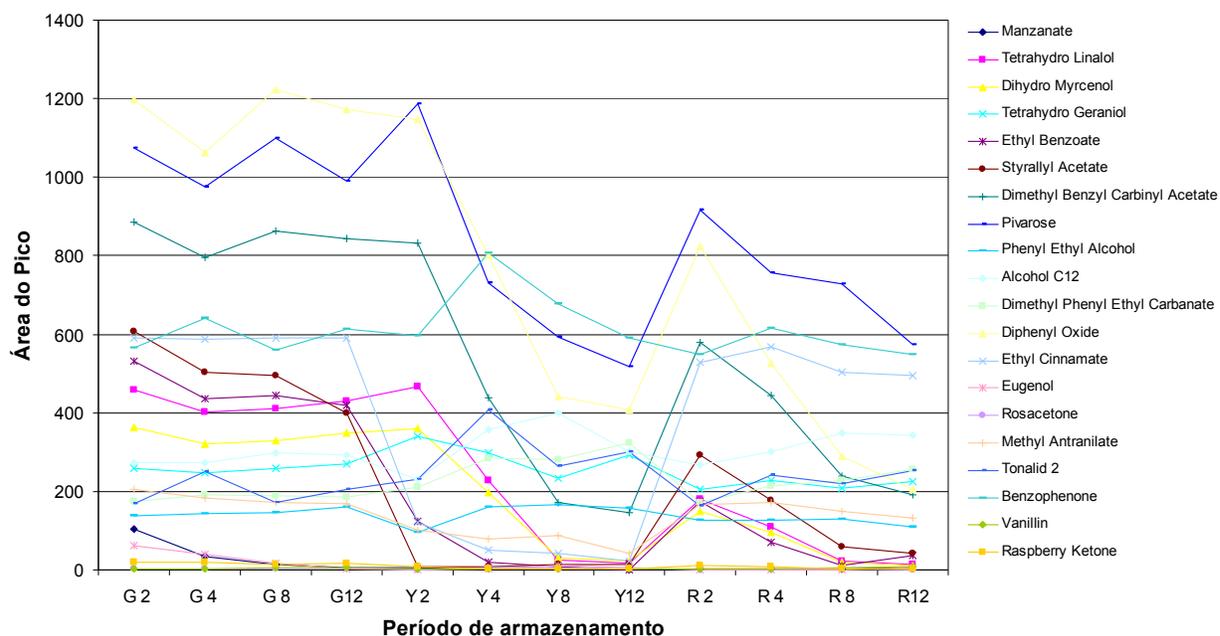


Figura 12: Indicação da variação de massa no transcorrer do período de armazenagem. G: Temperatura 4°C; Y: temperatura 35°C e umidade 70%; R: temperatura 45°C; 2: duas semanas; 4: quatro semanas; 8: oito semanas e 12: doze semanas.

2.4.4. Análise quimiométrica dos dados

Para facilitar a compreensão do grande volume de resultados cromatográficos obtidos foi utilizado dois métodos quimiométricos exploratórios, chamados HCA, (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*), e PCA, (do inglês, *Principal Component Analysis*). Como discutido anteriormente a HCA busca agrupar as amostras em classe, baseando-se na similaridade entre os participantes da mesma classe e na diferença entre os membros de classes diferentes. A representação gráfica é denominada de dendograma. A PCA visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original preservando a maior quantidade de informação (variância) possível.

2.4.4.1. Análise exploratória de todas as amostras

Inicialmente todos os resultados cromatográficos obtidos pelas amostras com e sem perfume foram submetidas à análise exploratória, com intuito de verificar se o método poderia discriminar amostras com e sem perfume, diferenciação facilmente observada quando as amostras são submetidas a uma avaliação sensorial.

As figuras 13 e 14 demonstram, embora a representação gráfica tenha sido obtida por algoritmos diferentes, a diferença entre as amostras com perfume e sem perfume, mostrando que essa diferença pode ser facilmente identificada nos gráficos de HCA e PCA.

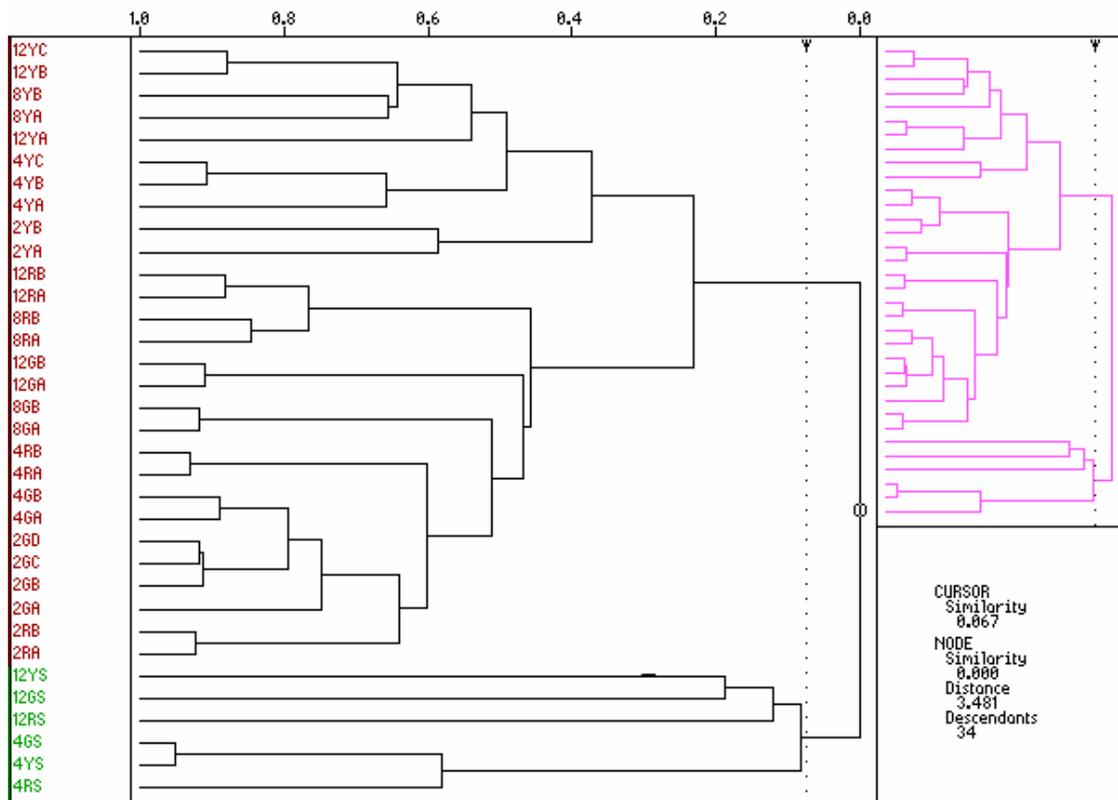


Figura 13: Dendrograma separando as amostras com perfume (marrom) e as amostras sem perfume (verde). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C); S amostras sem perfume; 2, 4, 8, 12 – números de semana e A, B e C número de replicatas.

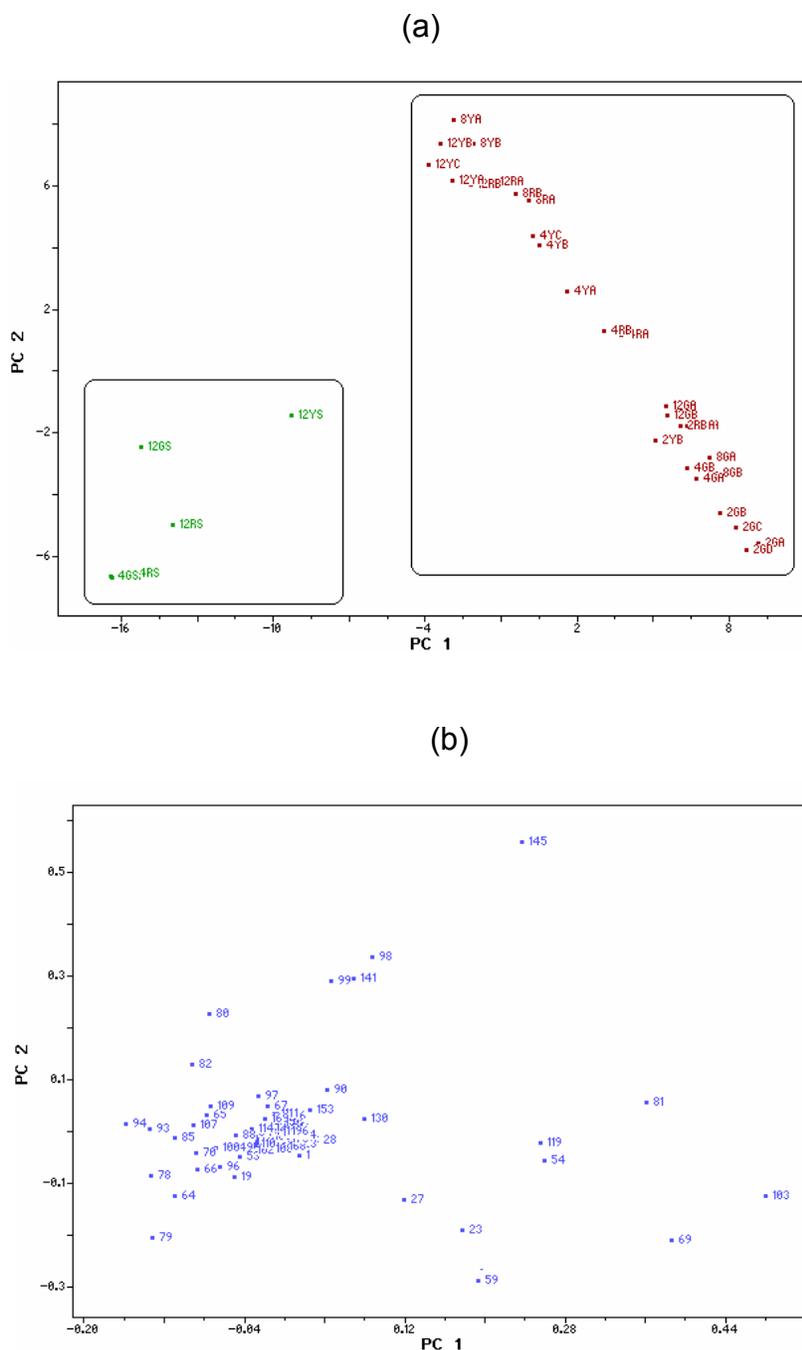


Figura 14: Gráfico de *scores* (a) e gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (52,4%) e na (PC2 19,7%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C); S amostras sem perfume; 2, 4, 8, 12 – números de semana e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de *loadings* correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma.

A análise por componentes principais demonstrou que um pequeno número de componentes principais explica a variabilidade total dos dados, i.e. as duas primeiras componentes principais explicam 72,4 da variabilidade total. A primeira componente principal é responsável por 52,4 % e a segunda por 19,7 % da informação total. Dois agrupamentos são observados quando os dados são expostos com relação às duas primeiras componentes principais, sendo que o grupo menor (verde) corresponde às amostras sem perfume e o grupo maior (marrom) às amostras com perfume. No entanto tal observação não surpreende, pois a primeira componente principal explica a máxima projeção unidimensional do total de variação dos dados obtidos.

2.4.4.2. Análise exploratória das amostras perfumadas

Excluindo as amostras que não possuem perfume, foi possível classificá-las de acordo com a condição de armazenagem, tanto pelo método de HCA quanto pelo método de PCA, conforme pode ser avaliado nas figuras 15 e 16.

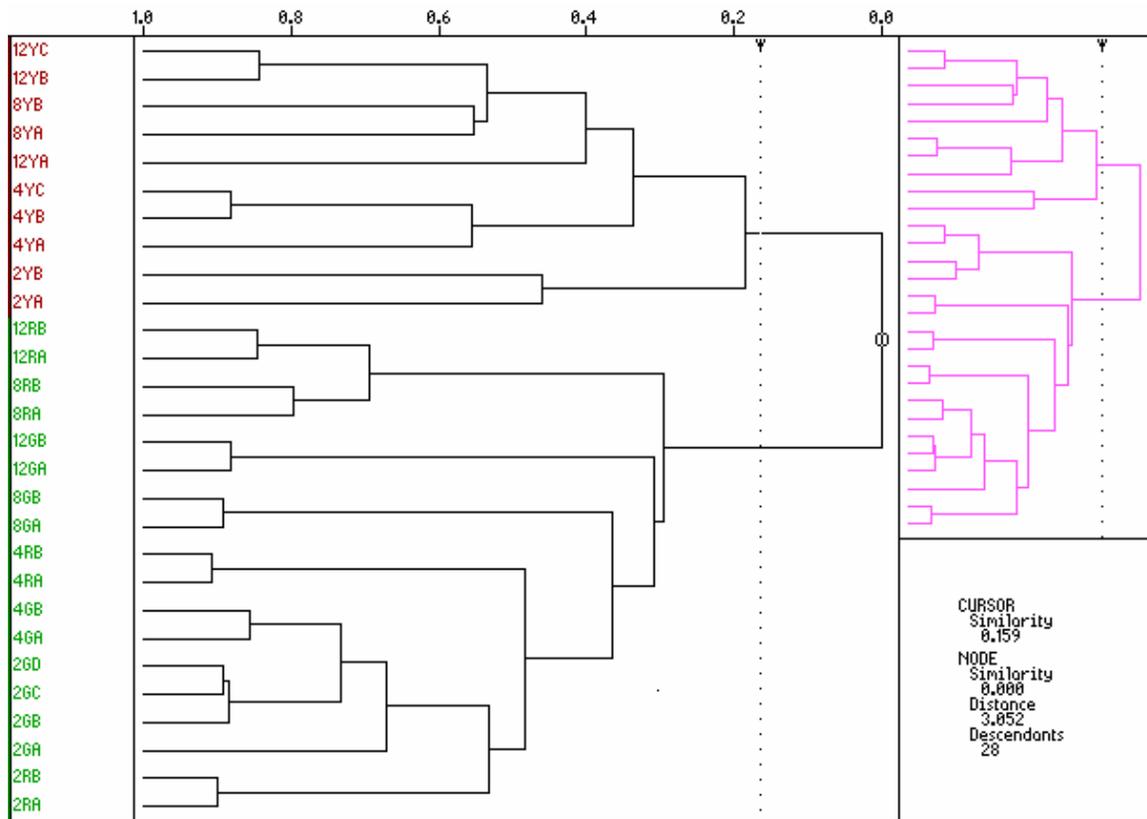


Figura 15: Dendrograma separando as amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas.

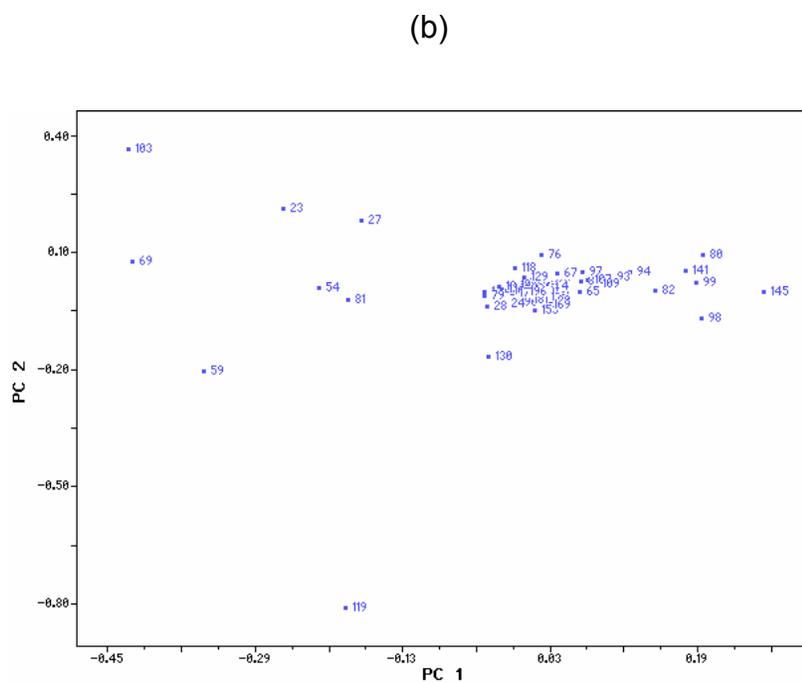
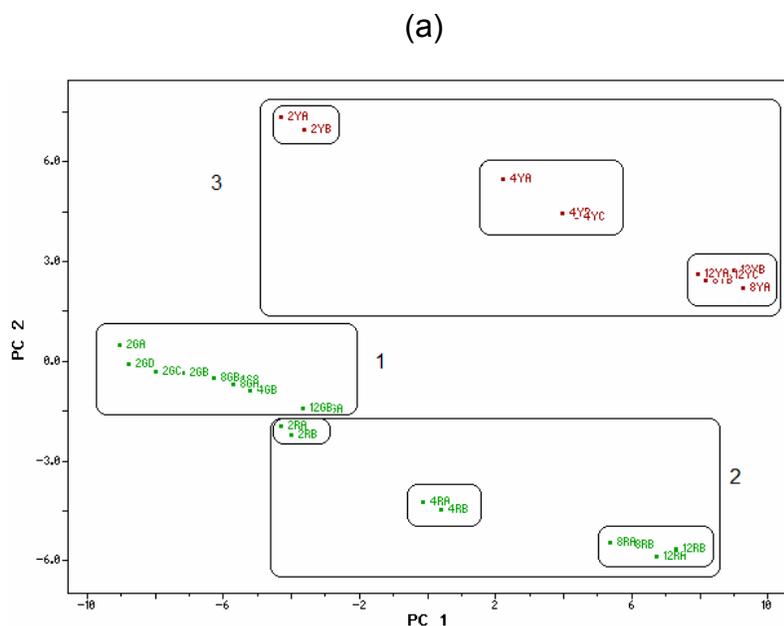


Figura 16: Gráfico de *scores* (a) e o gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (57.3%) e na PC2 (20.5%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de *loadings* correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma.

Na figura 16 (a) as amostras se agruparam em três grandes grupos. No agrupamento número 01, destacam-se as amostras que foram submetidas à armazenagem na geladeira (4 °C), no agrupamento número 02 estão localizadas as amostras que foram armazenadas a 45 °C e no terceiro grupo estão localizadas as amostras que foram armazenadas sob umidade 70 % e temperatura 37 °C.

Dentro desses grupos existem subgrupos menores que estão relacionados com o período de estocagem das amostras. Importante destacar que ao comparar os dendogramas com os gráficos da PCA, percebe-se que as informações são semelhantes, ou seja, independente do método quimiométrico utilizado, os resultados foram similares. Isso pode ser constatado comparando o dendograma da figura 13 com o gráfico de *scores* da figura 14 (a) onde foi evidenciada uma separação entre amostras com perfume e as amostras sem perfume. A mesma comparação pode ser realizada entre o dendograma da figura 15 e o gráfico de *scores* da figura 16 (a), mas nessa análise foi verificada uma divisão entre as amostras armazenadas em estufa (37°C / 70% UR) daquelas que foram armazenadas na geladeira (4 °C) e estufa (45 °C).

2.4.4.3. Seleção de variáveis das amostras perfumadas

Mesmo constatando que as amostras foram separadas pelos períodos e condições de estocagem, novas análises foram executadas para avaliar quais variáveis ou compostos influenciaram no agrupamento das amostras.

Selecionando somente as variáveis relacionadas às fragrâncias, ou seja, utilizando os picos que corresponde aos componentes da mistura, uma nova matriz foi gerada, agora apenas com 20 variáveis e novas análises exploratórias foram executadas.

Os resultados são apresentados nas figuras 17 e 18, sendo que no HCA obteve-se com um índice de similaridade de aproximadamente 0,25 e observou-se a formação de dois grupos: a classe situada na parte superior do dendograma que contém as amostras que foram armazenadas na estufa com umidade controlada e

o outro grupo contendo as demais amostras. Não foi possível identificar, com um índice de similaridade maior, a diferenciação mais detalhada de novos grupos. A análise de componentes principais possibilitou identificação dos grupos anteriormente mencionados, ou seja, a divisão de três grandes grupos, com seus subgrupos de acordo com as condições e tempo de armazenagem das amostras. A variação na PC1 sinaliza a diferenciação dos tempos de estocagem das amostras, na PC2 caracteriza-se pelas diferentes condições que as amostra foram armazenadas.

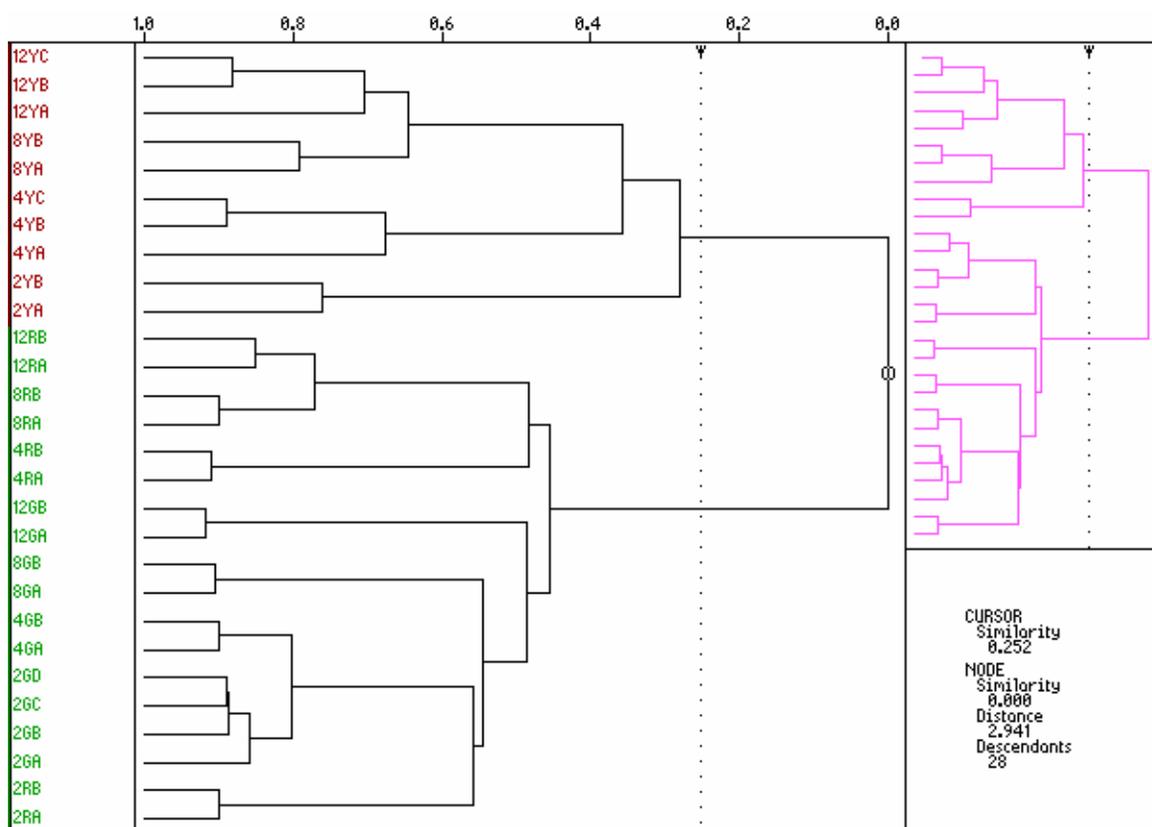


Figura 17: Dendrograma separando as amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas.

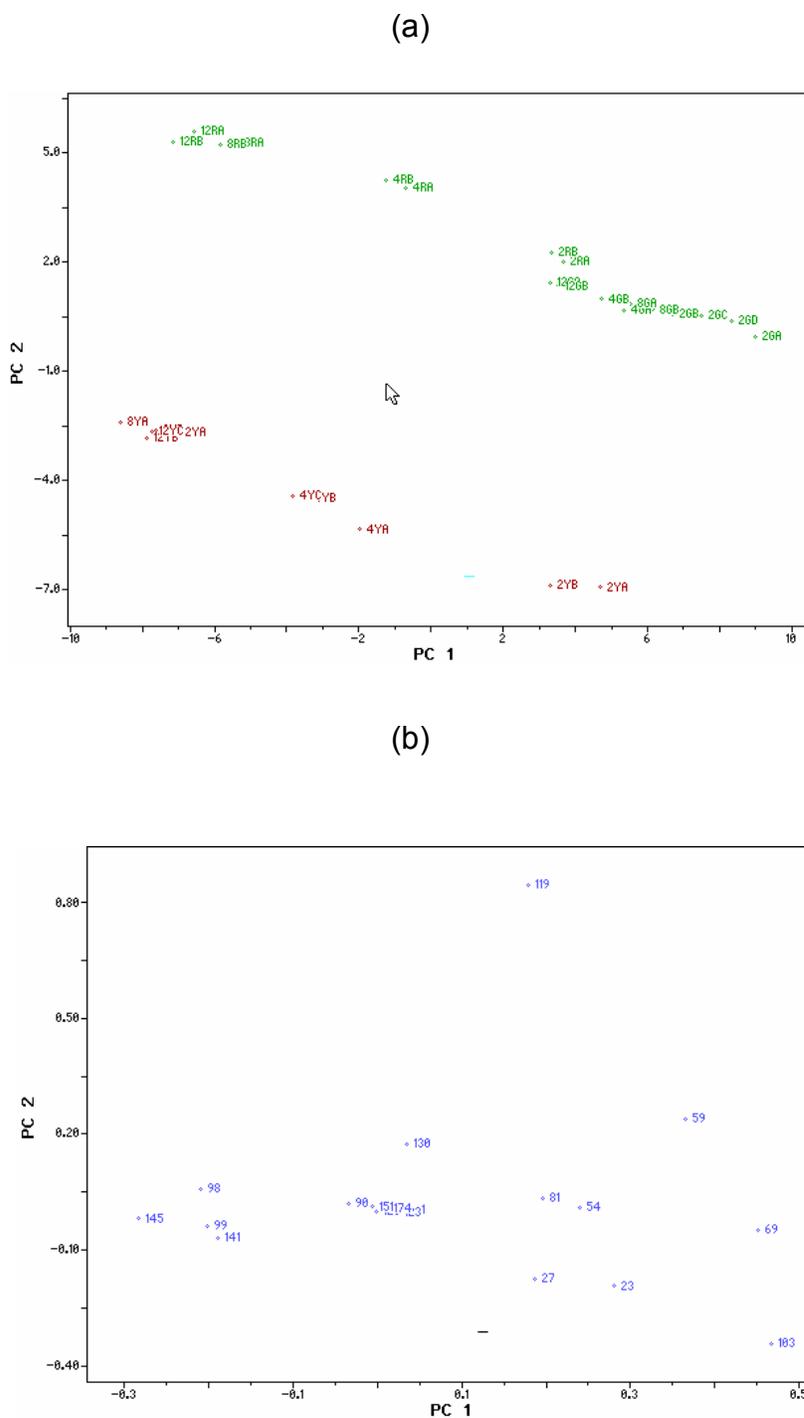


Figura 18: Gráfico de *scores* (a) e o gráfico de *loadings* (b). Variância explicada na PC1 (62.5%) e na PC2 (24.2%). G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas. Os pontos no gráfico de *loadings* correspondem ao tempo de retenção dos componentes no cromatograma.

O gráfico de *loadings* auxilia na discriminação das variáveis com maior influência na separação das amostras no gráfico de *scores*, avaliando os pesos dos componentes da fragrância que foram usadas para a análise de PCA. Com esse gráfico identificou-se que três substâncias apresentaram maior influência no modelo, os compostos codificados como 103, 119 e 145.

A fim de avaliar o quanto representavam na separação das amostras nos gráficos de *scores*, uma nova análise de HCA e PCA foi realizada, cujo resultado pode ser visualizado nas figuras 19 e 20.

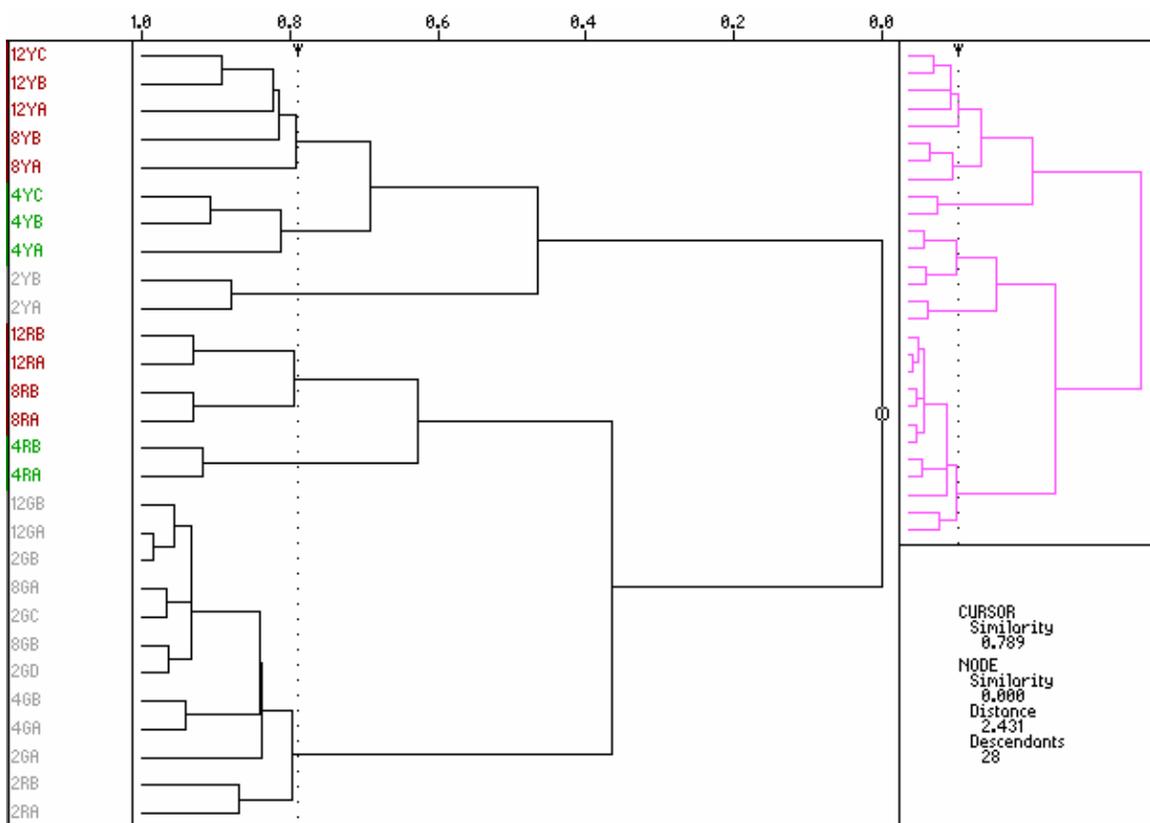


Figura 19: Dendrograma das amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas.

O HCA e o PCA apresentaram desempenho semelhante à análise anterior, destacando com isso a importância dos três compostos para os modelos. Os compostos codificados como 103, 119 e 145 são respectivamente Diphenyl Oxido, Ethyl Cinnamate e Benzophenone.

Uma nova análise exploratória foi proposta para avaliar se os compostos voláteis da base sem as variáveis da fragrância poderiam auxiliar também no agrupamento das amostras como foi verificado com os componentes da mistura, no entanto nenhuma classe entre as amostras foi identificada conforme demonstrado nas figuras 21 e 22.

Essa constatação permite supor que a análise da fragrância pelo método de SPME no *headspace* de uma amostra perfumada auxilia na identificação quanto ao tempo e às condições que o produto foi submetido durante sua estocagem, possibilitando com isso a avaliação das condições de embalagem, armazenamento e tempo de vida útil do produto.

É importante considerar que o conhecimento do desempenho da fragrância com o tempo de armazenagem permite a indústria de fragrâncias caracterizar seus desempenhos e desenvolver novos produtos com características direcionadas às necessidades de cada aplicação.

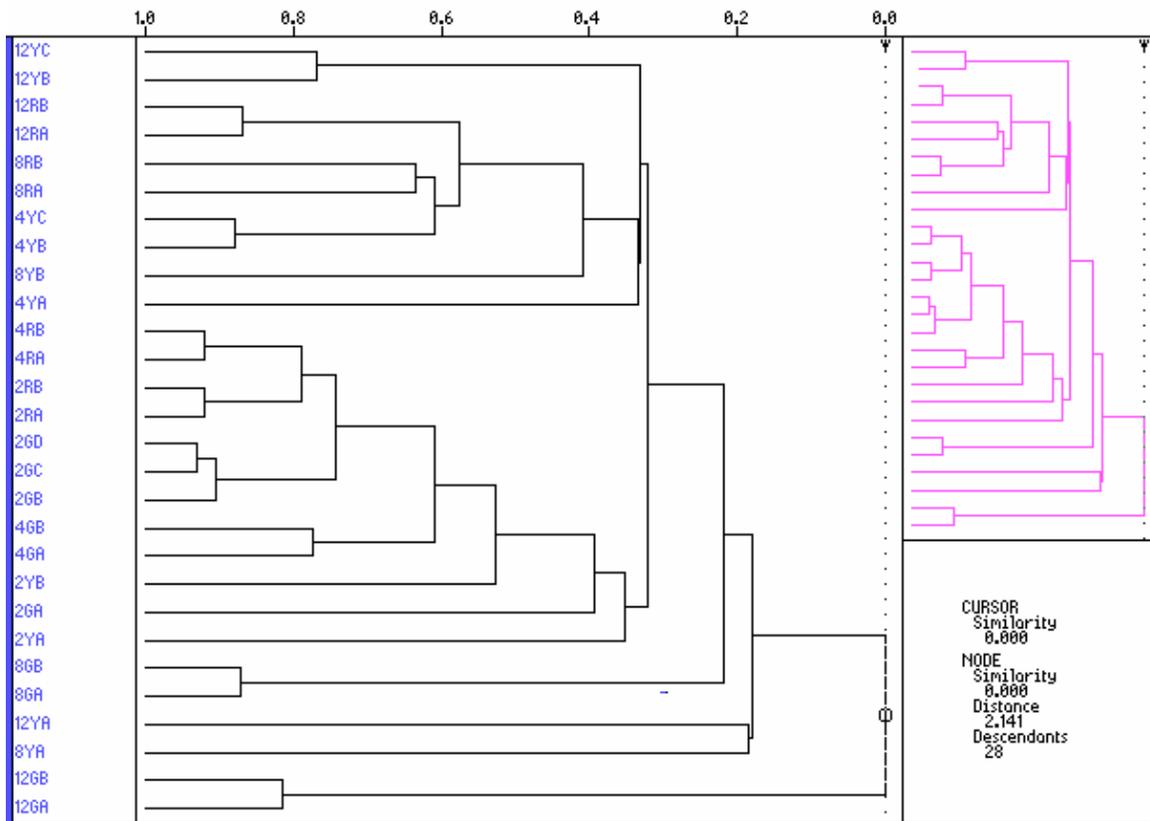


Figura 21: Dendrograma das amostras por diferentes condições de armazenagem. G – Geladeira (4°C); Y – Estufa (37°C / 70% UR); R – Estufa (45°C) e A, B e C número de replicatas.

Capítulo 3 - Previsão de densidade e índice de refração a partir de dados cromatográficos.

3.1. Introdução

Fragrâncias são obtidas de uma complexa mistura de compostos que podem apresentar variadas estruturas químicas como aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, hidrocarbonetos entre outras. Para avaliação da qualidade dessas misturas a indústria de perfumaria emprega vários métodos e instrumentos para controlar a especificação desses produtos. Devido a sua facilidade e rapidez, um dos parâmetros mais controlados nesse segmento são as características físicas dos materiais como densidade e índice de refração, pois com essas análises é possível identificar se há grandes variações quantitativas ou qualitativas nos lotes fabricados. No entanto, variações mais sutis só podem ser observadas com técnicas mais elaboradas que possam identificar e quantificar cada componente da mistura. Atualmente a técnica mais utilizada para essa finalidade é a cromatografia gasosa, por apresentar alta resolução dos picos, grande sensibilidade e reprodutibilidade, auxiliando dessa forma a monitorar todos os componentes da formulação nos mais variados níveis de concentração [7][23].

Para controlar todos os parâmetros especificados são necessários diferentes tipos de equipamentos, isso envolve custos de manutenção para cada equipamento, incorreções nas leituras dos resultados analíticos, aumento no

tempo das análises, entre outros fatores. Quimiometria é uma técnica que pode ser utilizada para auxiliar na otimização dos métodos analíticos na área de qualidade. Estudos demonstram a possibilidade de correlacionar parâmetros físico-químicos da gasolina com dados obtidos por cromatografia [45], no entanto não há registro dessa aplicação em fragrâncias.

3.2. Objetivo

Esta etapa do trabalho teve como objetivo a previsão de valores físico-químicos de fragrâncias (mistura de componentes) a partir de dados cromatográficos utilizando calibração multivariada.

3.3. Experimental

3.3.1. Reagentes

As amostras dos óleos das fragrâncias foram fornecidas pela *Quest International* e correspondem a produtos de sua linha produção, portanto são matérias que não serão identificados pelo nome comercial devido a sua confidencialidade. O número total de amostras fornecidas foi de 45 diferentes fragrâncias. Cada fragrância é uma mistura de vários compostos naturais ou sintéticos em diferentes proporções. O reagente utilizado para diluição das amostras foi Acetona PA.

3.3.2. Instrumental

Amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (GC-FID) 6890N, Agilent Technologies de acordo com um método padrão validado pela Quest Internacional. Para construção do modelo

matemático, as variáveis independentes foram obtidas pelo GC-FID, com injetor automático e coluna capilar DB-WAX (25m x 200um x 0,2um). As variáveis dependentes, compostas pelas propriedades físicas, densidade e índice de refração, foram adquiridas usando um Densímetro Digital DMA 38, Anton Paar, e um Refratômetro Analógico, Atago.

Um modelo PLS (do inglês, Partial Least Squares) foi gerado para duas variáveis dependentes usando uma matriz composta de 45 amostras e 675 variáveis independentes. Os dados foram tratados com o software Pirouette 3.02.

3.3.3. Preparo das amostras

As amostras foram diluídas a 1,0 % (m / m) e injetadas diretamente no cromatógrafo com o injetor automático.

3.3.4. Análise cromatográfica

Após a diluição, as amostras foram disponibilizadas no carrossel do injetor automático para injeção das amostras no modo split. As condições de separação foram às seguintes: temperatura inicial do forno 70 °C, aquecimento 13 °C / min até a temperatura final 250 °C e mantida por 8 minutos, temperatura do injetor e detector foram mantidas 200 °C e 300 °C respectivamente. O hidrogênio, pureza 5,0, White Martins (Osasco, SP, Brasil), foi utilizado como gás de arraste com pressão 15,0 psi e fluxo 3,2 mL / min. O hidrogênio e ar sintético foram utilizados no detector com fluxo de 28,7 mL / min para o hidrogênio e 450,0 mL / min para o ar sintético.

3.3.5. Análise da densidade e índice de refração

Para a análise de densidade foi injetado 1,0 mL da amostra no Densímetro Digital que possui como dispositivo uma célula de medição de densidade pelo princípio do tubo em U, acoplado a um termômetro de platina para auto ajuste de temperatura. As amostras foram medidas a 20 °C.

Para a análise do índice de refração foi adicionado uma gota da amostra sobre o prisma do refratômetro e posteriormente incidida luz branca para observação do índice de refração. O refratômetro possui um banho termostatizado para o controle de temperatura. Todas as amostras foram analisadas a 20 °C.

3.4. Resultados e discussão

As variáveis consideradas dependentes foram as áreas de cada pico obtidas pelo GC-FID. Essas áreas foram normalizadas com o objetivo de diminuir a influência do volume de amostra injetado no equipamento.

Uma análise exploratória inicial foi realizada com todas as amostras para verificação de algum *outlier* entre as fragrâncias, a fim de eliminá-los do modelo que foi proposto.

Cada ponto indicado na figura 24 corresponde a uma fragrância, ou seja, uma mistura de dezenas de componentes com diferentes propriedades físico-químicas e odoríferas. A codificação utilizada foi somente para diferenciação dessas fragrâncias, uma vez que elas não possuem uma denominação comercial e sua formulação é confidencial.

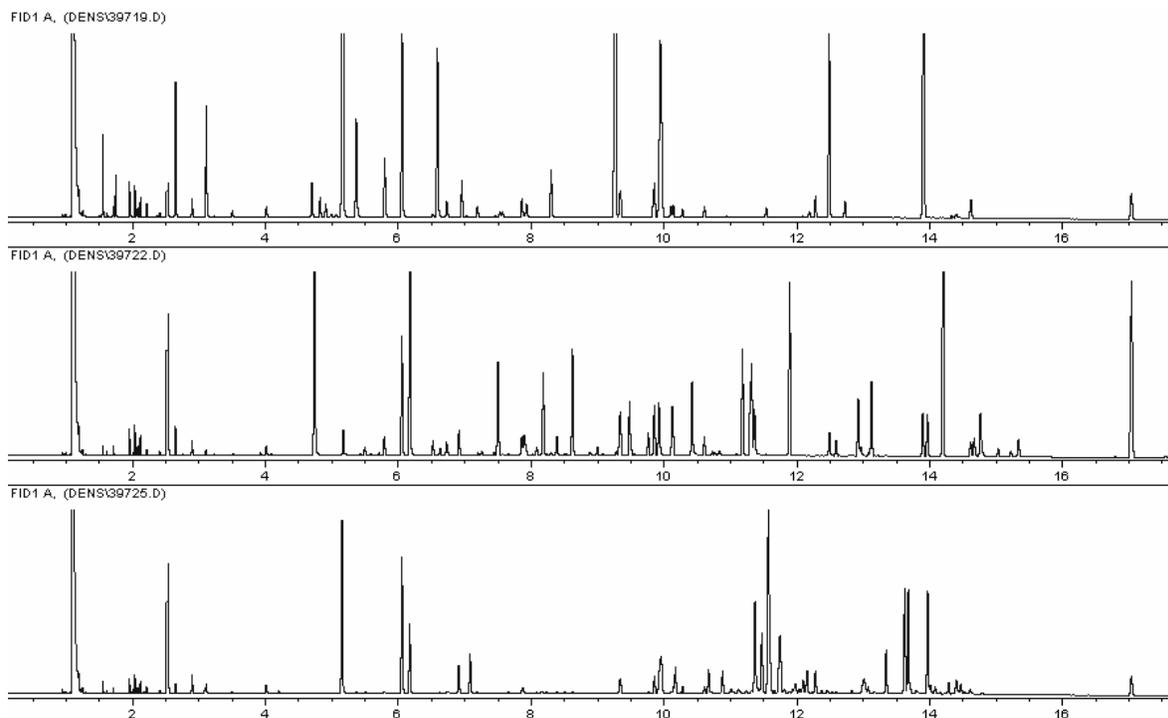


Figura 23: Típico resultado de análise cromatográfica para três diferentes fragrâncias.

Inicialmente todas as amostras foram empregadas para avaliação da qualidade do conjunto, a fim de identificar possíveis *outliers* que poderiam prejudicar na construção do modelo. Para a detecção de *outliers*, usaram-se duas grandezas complementares: *Leverage* e resíduos de *Student*.

A *Leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão, ou seja, quando há uma amostra com pequeno valor de *Leverage*, significa que essa amostra influencia pouco o modelo de calibração. Caso ocorra o contrário tem-se uma alta influência da amostra no modelo, e isso pode ser negativo, caso seja constatado que se trata de uma amostra anômala. O resíduo de *Student* avalia a distribuição das amostras e são definidos com unidade de desvio padrão. Amostras que estão fora da distribuição devem ser cuidadosamente avaliadas. As amostras que apresentam um alto resíduo de *Student* devem ser excluídas e as com alto *Leverage* devem ser avaliadas quanto a sua influência e caso seja negativa são também eliminadas e o modelo de calibração reconstruído.

Tabela 4 - Resultados medidos de densidade e índice de refração para todas as fragrâncias avaliadas.

<i>Lote da fragrância</i>	<i>Densidade medida (± 0.0002 g/cm³)</i>	<i>Índice de Refração medido (± 0,001 nD)</i>
39719	0.9425	1.498
39722	0.9732	1.491
39725	0.9531	1.485
39760	0.9295	1.464
39761	1.0033	1.492
39772	1.0258	1.493
39791	0.9210	1.471
39793	0.9291	1.472
39794	0.9675	1.480
39808	0.9939	1.463
39812	0.9428	1.479
39848	0.9614	1.465
41170	0.8915	1.458
41217	0.9098	1.470
41220	0.9099	1.452
41221	0.9814	1.463
41228	0.9638	1.464
41230	0.9597	1.489
41248	1.0218	1.510
41271	1.0167	1.483
41272	0.9815	1.476
41285	1.0072	1.507
41286	0.9756	1.459
41296	0.9321	1.479
41297	0.9927	1.475
41313	0.9690	1.464
41324	0.9714	1.480
41339	1.0210	1.483
41351	0.9791	1.478
41357	0.9428	1.477
41359	0.9720	1.481
41376	0.9258	1.457
41385	0.9809	1.476
41401	0.9473	1.497
41402	0.9609	1.469
41421	1.0759	1.466
SS0962	0.9929	1.462
SS0964	1.0232	1.467
SS0966	0.9809	1.455
SS0968	0.9863	1.461
SS0970	0.8904	1.477
SS0980	0.9960	1.452
SS0982	0.9404	1.455
SS0988	0.9646	1.475
SS0999	0.9721	1.484

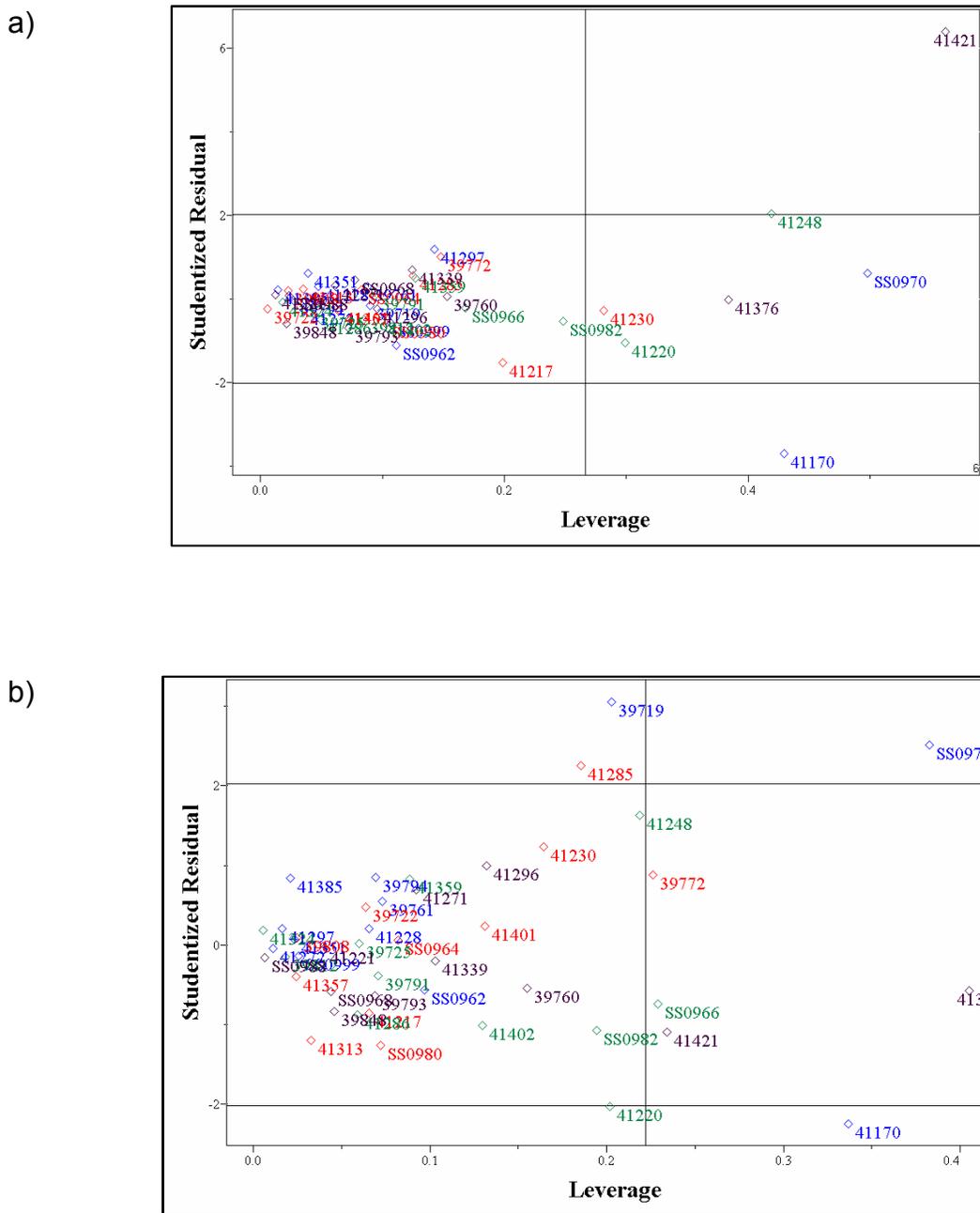


Figura 24: Avaliação de *outliers* para as medições de a) densidade e b) índice de refração

Analisando o gráfico *Leverage* x Resíduo de *Student* concluiu-se que as amostras 41421 e 41170 apresentaram alto resíduo e a amostra SS0970 alto *Leverage*, para o modelo relacionado à densidade. No caso do Índice de

Refração, a amostra 41170 continuou com alto resíduo juntamente com a SS970, e a amostra que apresentou maior influência foi a 41376 em relação ao *Leverage*.

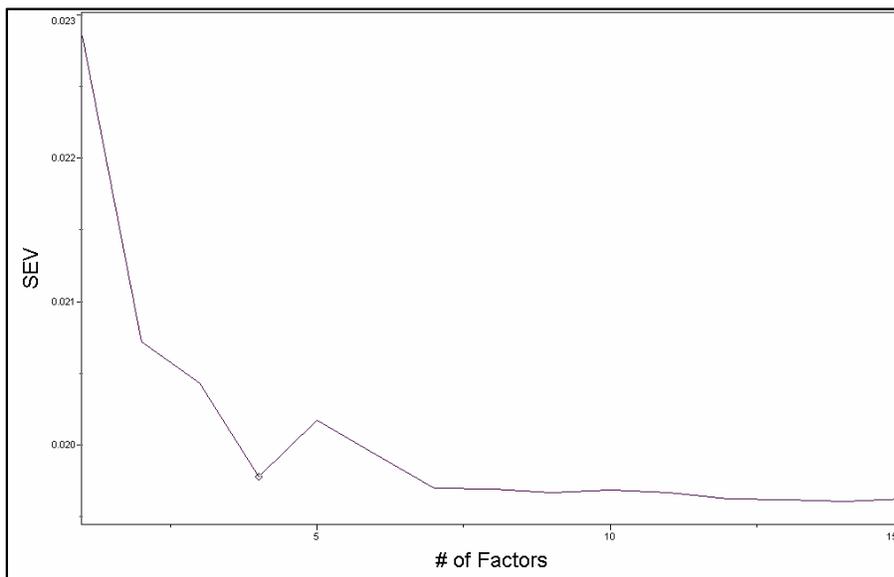
Para elaborar o modelo de PLS foram excluídas as amostras 41421 e 41170. Dentre as amostras restantes, 10 foram separadas para previsão e as outras 33 para construção do modelo.

Segue abaixo os resultados obtidos para elaboração do modelo de densidade e índice de refração somente com as 33 amostras.

3.4.1. Construção do modelo para densidade

Para escolha do número de variáveis latentes, foi avaliado o valor de SEV (Erro Padrão de Validação) e PRESS (Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão). O número de variável latente considerado mais adequado é aquele que apresenta um baixo valor de SEV e PRESS, sem com isso aumentar o número de fatores. De acordo com o gráfico SEV x número de fatores (figura 24) e a tabela 04, o número de 04 variáveis latente foi considerado o mais adequado para o modelo de previsão de densidade.

a)



b)

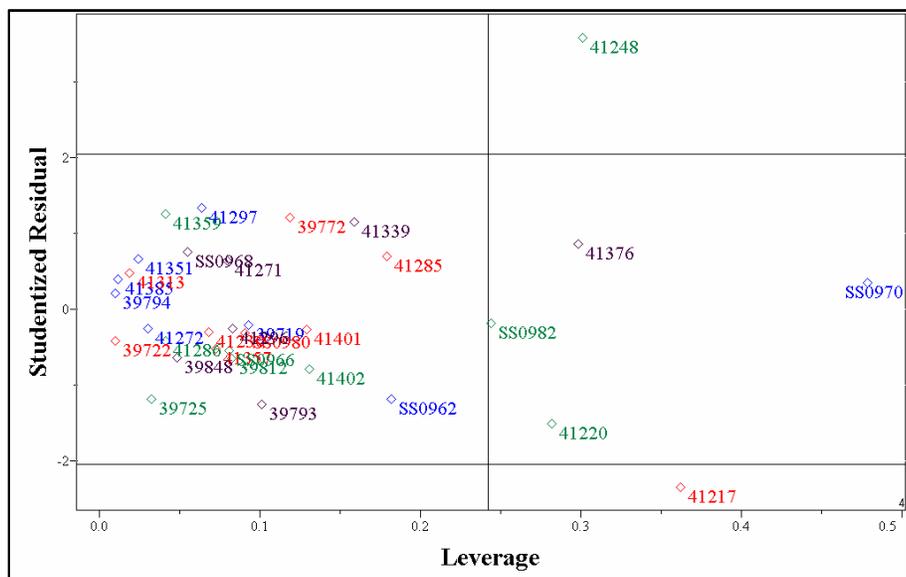


Figura 25: Gráfico a) SEV em função do número de fatores e b) Detecção de outliers através do gráfico Resíduo de Student x Leverage para análise do modelo.

Tabela 5: Resultado dos parâmetros para definição do número de fatores usados no modelo para densidade.

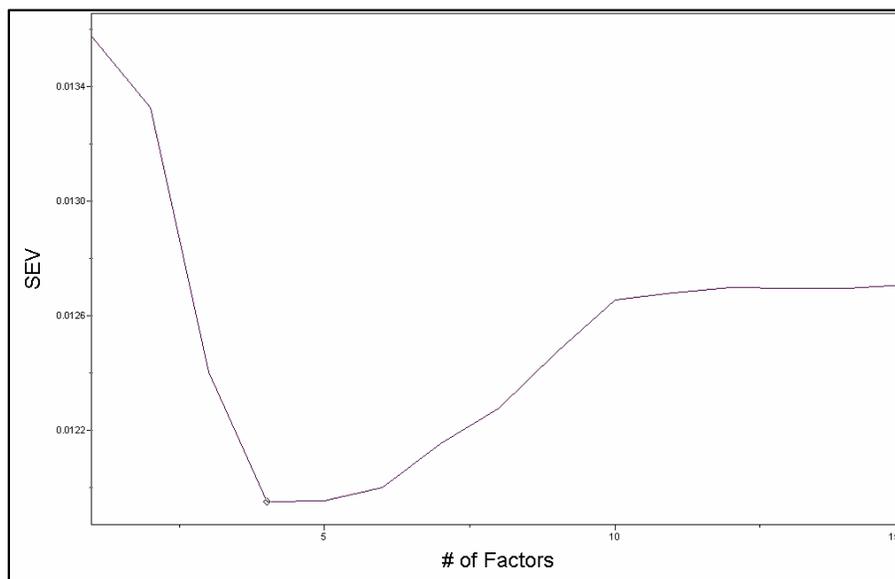
	SEV ¹	Press Val ²	r Val ³	SEC ⁴	Press Cal ⁵	r Cal ⁶
Fator1	0,023	0,017	0,766	0,015	0,007	0,905
Fator2	0,021	0,014	0,786	0,009	0,002	0,967
Fator3	0,020	0,014	0,795	0,007	0,001	0,979
Fator4	0,020	0,013	0,806	0,005	0,001	0,991
Fator5	0,020	0,013	0,798	0,003	0,000	0,997
Fator6	0,020	0,013	0,803	0,002	0,000	0,998
Fator7	0,020	0,013	0,808	0,002	0,000	0,999
Fator8	0,020	0,013	0,808	0,001	0,000	1,000
Fator9	0,020	0,013	0,809	0,001	0,000	1,000
Fator10	0,020	0,013	0,808	0,001	0,000	1,000

1 – Erro padrão de validação, 2 – Soma dos quadrados dos erros de validação, 3 - Fator de correlação de validação, 4 - Erro padrão de calibração, 5 - Soma dos quadrados dos erros de calibração, 6 – Coeficiente de correlação de calibração

3.4.2. Construção do modelo para índice de refração

A figura 25 e a tabela 5 apresentam os parâmetros para a definição do número de fatores usados no modelo para índice de refração. Avaliando a figura e a tabela, considerou-se 4 variáveis latente como mais adequado. Ao analisar os gráficos de *Leverage* x Resíduo de *Student*, percebe-se que outras amostras podem assumir o papel de amostras “anômalas”, mas como já foram retiradas algumas amostras no início do trabalho, decidiu-se não eliminá-las para não reduzir demasiadamente o número de amostras para fazer a calibração.

a)



b)

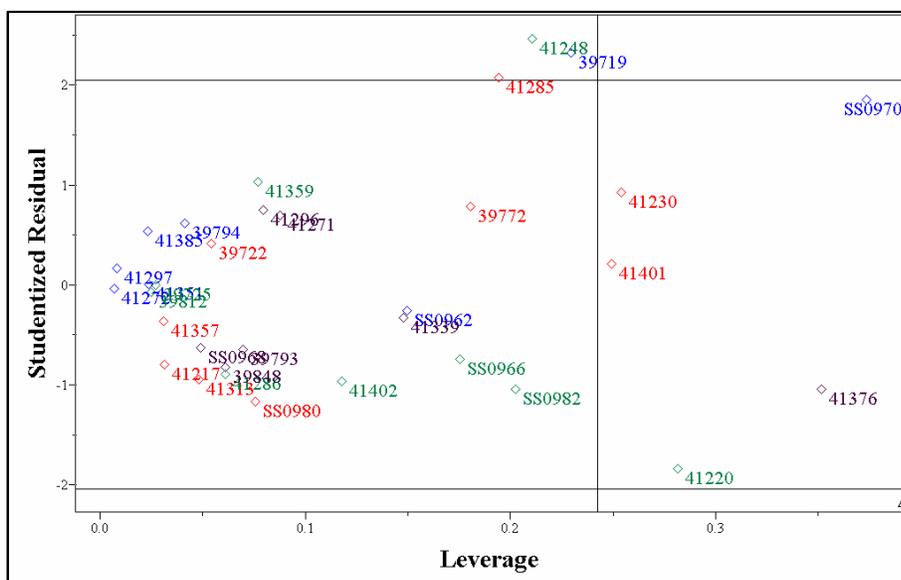


Figura 26: Gráfico a) SEV em função do número de fatores e b) Detecção de outliers através do gráfico Resíduo de Student \times Leverage para análise do modelo.

Tabela 6: Resultado dos parâmetros para definição do número de fatores usados no modelo para Índice de Refração.

	SEV ¹	Press Val ²	r Val ³	SEC ⁴	Press Cal ⁵	r Cal ⁶
Factor1	0,014	0,006	0,436	0,009	0,002	0,835
Factor2	0,013	0,006	0,469	0,005	0,001	0,942
Factor3	0,012	0,005	0,569	0,004	0,000	0,973
Factor4	0,012	0,005	0,614	0,003	0,000	0,986
Factor5	0,012	0,005	0,609	0,002	0,000	0,990
Factor6	0,012	0,005	0,604	0,002	0,000	0,993
Factor7	0,012	0,005	0,590	0,001	0,000	0,997
Factor8	0,012	0,005	0,579	0,001	0,000	0,998
Factor9	0,012	0,005	0,563	0,001	0,000	0,999
Factor10	0,013	0,005	0,548	0,001	0,000	0,999

1 – Erro padrão de validação, 2 – Soma dos quadrados dos erros de validação, 3 – Fator de correlação de validação, 4 - Erro padrão de calibração, 5 - Soma dos quadrados dos erros de calibração, 6 – Coeficiente de correlação de calibração

Após otimização e validação do modelo de calibração por PLS, este foi utilizado para prever as propriedades físico-químicas de interesse.

3.4.3. Resultados de previsão para densidade e índice de refração.

Os resultados obtidos com quatro variáveis latentes para validação externa do modelo apresentaram erros de no máximo 0,94 % para densidade e 0,32 % para o índice de refração, conforme pode ser constatado na tabela 07. Os valores de SEP e PRESS foram considerados bem pequenos, 0,0048 e 0,0002 para densidade e 0,0027 e 0,0001 para o índice de refração, evidenciando a boa capacidade de previsão do modelo. Um índice de correlação de 0,99 para densidade e 0,96 para índice de refração foi obtido utilizando o mesmo modelo, para ambos os casos, conforme a tabela 08.

Tabela 7: Valores de previsão para densidade e índice de refração utilizando o modelo PLS.

Amostra	Densidade				Índice de Refração			
	Valor Med.	Valor Prev.	Resíduo	Erro (%)	Valor Med.	Valor Prev.	Resíduo	Erro (%)
39760	0,9295	0,9248	0,0047	0,5051	1,4640	1,4681	-0,0041	-0,2828
39761	1,0033	1,0019	0,0014	0,1361	1,4920	1,4883	0,0037	0,2479
39791	0,9210	0,9258	-0,0048	-0,5193	1,4710	1,4743	-0,0033	-0,2258
39808	0,9939	0,9878	0,0061	0,6144	1,4630	1,4644	-0,0014	-0,0960
41221	0,9814	0,9785	0,0029	0,2981	1,4630	1,4634	-0,0004	-0,0293
41228	0,9638	0,9588	0,0050	0,5182	1,4640	1,4637	0,0003	0,0172
41324	0,9714	0,9748	-0,0034	-0,3464	1,4800	1,4785	0,0015	0,1026
SS0964	1,0232	1,0136	0,0096	0,9429	1,4670	1,4669	0,0001	0,0083
SS0988	0,9646	0,9657	-0,0011	-0,1092	1,4750	1,4775	-0,0025	-0,1686
SS0999	0,9721	0,9750	-0,0029	-0,2971	1,4840	1,4887	-0,0047	-0,3175

Tabela 8: Dados obtidos após o uso do modelo para previsão das propriedades físicas das fragrâncias.

	SEP ¹	PRESS ²	R ³	VL ⁴
Densidade	0,0048	0,0002	0,9904	4
Índice de Refração	0,0027	0,0001	0,9658	4

1 - Erro padrão de previsão, 2 - Soma dos quadrados dos erros de previsão, 3 - Coeficiente de correlação, 4 - Número de variáveis latentes

Esses resultados demonstram que é possível realizar análises físico-químicas de fragrâncias usando dados cromatográficos e métodos quimiométricos, reduzindo com isso o custo e o tempo de análise nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias de perfumaria.

É importante ressaltar que para viabilizar esse procedimento foi fundamental o uso de um método de calibração multivariada, PLS, que auxiliou na correlação dos dados cromatográficos com os respectivos valores de densidade e índice de refração, demonstrando ser possível prever propriedades físico-químicas de amostras complexas com informações de natureza cromatográfica.

Conclusões

O corrente trabalho pode ser avaliado em três etapas, a primeira está relacionada com a otimização dos parâmetros da microextração em fase sólida no *headspace* do detergente em pó para análise por cromatografia gasosa dos compostos voláteis, com ênfase no perfume desenvolvido para avaliação de seu desempenho. A segunda está relacionada ao tratamento dos dados por métodos quimiométricos para auxiliar na compreensão dos resultados obtidos na primeira fase. A última etapa, não totalmente relacionada às anteriores, procura desenvolver um método de calibração multivariada para prever alguns parâmetros físico-químicos importantes no controle de qualidade de fragrâncias.

A proposta da primeira fase foi encontrar um método analítico que pudesse de alguma maneira reproduzir a avaliação sensorial realizada na indústria, mas que pudesse oferecer resultado tanto qualitativo quanto quantitativo de cada componente de uma fragrância. Para isso alguns métodos de extração foram avaliados, mas o que mais aproximou-se desse objetivo foi o de SPME, pois dentre as suas vantagens pode se destacar algumas que foram determinantes na sua escolha, como possibilidade de extração no *headspace* da amostra, perda reduzida do analito extraído, simplicidade na manipulação do equipamento, a não necessidade de manipulação de solventes orgânicos, habilidade de concentrar os compostos voláteis e a facilidade de injeção direta no cromatógrafo, reduzindo o tempo de extração e análise das amostras. Todas essas características puderam ser avaliadas e confirmadas durante o trabalho, no entanto, algumas dificuldades foram identificadas, como o tempo necessário para encontrar os parâmetros ideais de extração dentre eles: o tipo de fibra, a quantidade de amostra, o efeito da temperatura, o tempo de pré-equilíbrio e o tempo de adsorção. Outra dificuldade encontrada foi estabelecer um processo adequado para aplicação da fragrância no detergente em pó, porque caso a amostra não estivesse homogênea, devido à sensibilidade na extração, não era possível obter uma reprodutibilidade aceitável.

Os parâmetros otimizados foram semelhantes aos obtidos em literatura para produtos líquidos perfumados. Com os parâmetros de extração otimizados, curvas analíticas foram construídas para a quantificação de cada componente na amostra. Idealmente a proposta era a obtenção de curvas que pudessem abranger toda a faixa de concentração, no entanto, isso não foi alcançado, em alguns casos as concentrações ficaram abaixo do limite de quantificação obtido. Uma alternativa encontrada foi a avaliação da área relativa dos picos para cada componente, comparando os dados obtidos com as amostra armazenadas a 4°C com as demais condições. Essa comparação auxiliou na identificação dos diferentes comportamentos das substâncias quando aplicadas na base de detergente em pó.

Na segunda etapa, com todos os dados originados da primeira, identificou-se a oportunidade de utilização de métodos quimiométricos para extração de maiores informações dos dados. Os métodos adotados foram HCA e PCA que auxiliaram no agrupamento das amostras de acordo com sua similaridade. Vários grupos foram identificados de acordo com o seu período e local de estocagem. É importante destacar que essa variação está relacionada à composição da fragrância no *headspace*, resultado esse constatado no transcorrer do trabalho.

Essa conclusão evidencia a potencialidade do método de avaliação de fragrâncias analisando o *headspace* da amostra por SPME-GC em conjunto com as ferramentas quimiométricas, auxiliando não somente na elaboração de novas fragrâncias, pois pode-se identificar com ele os componentes que mais influenciam uma fragrância, como também pode-se avaliar os períodos e condições que as amostras foram submetidas durante sua estocagem.

Na última etapa do trabalho, um modelo de calibração multivariada, PLS, foi desenvolvido para prever a densidade e o índice de refração a partir de dados cromatográficos obtidos de 45 amostras comerciais de fragrâncias. Alguns procedimentos foram realizados para adequação dos dados, como normalizar as áreas dos picos cromatográficos, centralizar os dados na média, avaliar a presença de *outliers*. Após o pré-tratamento dos dados, uma etapa de modelagem com 33 amostras e uma de validação externa com 10 amostras foram realizadas. Os resultados de SEP e PRESS para a validação do modelo foram 0,0048 e

Conclusões.

0,0002 para densidade e 0,0027 e 0,0001 para o índice de refração. O erro máximo obtido para densidade foi 0,94 % e para o índice de refração 0,32 %. Esses resultados destacam a possibilidade de uma nova aplicação para dados cromatográficos em conjunto com os métodos quimiométricos.

De uma maneira geral este trabalho alcançou em sua maioria os objetivos destacados inicialmente. Dentre os resultados mais significativos podem-se ressaltar o desenvolvimento de um método confiável de SPME para extração de fragrância em detergente em pó, o monitoramento da estabilidade da fragrância utilizando a técnica de SPME por cromatografia gasosa e ferramentas quimiométricas e a possibilidade de previsão de parâmetros físico-químicos a partir de dados cromatográficos.

Referências Bibliográficas

- [1] Dutra, L. C. “Otimismo para Household em 2007”, *Household & Cosméticos*, 2007, 43, 54 - 58.
- [2] Anuário ABIPLA, Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza a Afins, 2007 – <http://www.abipla.org.br/> - acessada em 12/2008
- [3] “A perfumaria funcional: sabão em pó, amaciante e detergente”, *Cosm. & Perf.*, 2001, 11, 16 – 33.
- [4] Pybus, H. D.; Sell, C. S. “The Chemistry of Fragrances”, RSC Paperbacks, Ashford, 1999.
- [5] Augusto, F. Zini, C. A. “Sampling and sample preparation for fragrance analysis”, em *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory – Fundamentals and New Directions in Sample Preparation*, Pawliszyn, J. (editor), *Comp. Anal. Chem.*, 2002, 699 – 719.
- [6] Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. “Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses”, VCH, Weinheim, 1990.
- [7] Y. Masada, “Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry”, John Wiley, New York, 1976.
- [8] Swigar, A. A.; Silverstein, R.M., “Monoterpenes: Infrared, Mass, ¹H NMR and ¹³ C NMR Spectra, and Kovats Indices”, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, 1981.
- [9] Müller, P. M.; Lamparsky, D. “Perfumes: Art, Science & Technology”, Black. Acad. & Professional, Dübendorf, 1990.
- [10] Núñez, A. J.; Gonzáles, L. F.; Janák, J. “Preconcentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatograph”. *J. Chromatogr.*, 1984, 300, 127 – 162.
- [11] Land, D. G. “Some factors influencing the perception of flavor-contributing substances in food” em *Progress in Flavor Research*, Land, D. G. & Nursten, H. F. (editores), Applied Science Publishers, London, 1982.
- [12] Walradt, J. P. “Analysis of Fragrance materials” em *Fragrance Chemistry: the science of the sense of smell*. Theimer, E. T. (Editor) Academic Press, New York, 1982.
- [13] Pawliszyn, J. “Solid Phase Microextraction: theory and practice”, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [14] Stevenson, R. J.; Chen, X. D.; Mills, O. E, “Modern Flavour Volatile Analysis – with particular reference to dairy products” *Food Res. Int.*, 1996, 29, 265 – 290.
- [15] Stránský, K.; Valterová, I. “Release of Volatiles during the flowering period of *Hydrosme rivieri* (Araceae)” *Phytochemistry*, 1999, 52, 1387 – 1390.
- [16] Rankin, A. S.; Bodyfelt, F. W. “Solvent Desorption Dynamic Headspace Method for Diacetyl and Acetoin in Buttermilk” *J. Food Sci.*, 1995, 60, 1205 – 1207.

- [17] Valero, E.; Miranda, E.; Sanz, J.; Martín-Castro, I. "Automatic thermal desorption in GC analysis of dairy product volatiles" *Chromatographia*, 1997, 44, 59 – 64.
- [18] Lanças, F. M. "Extração com Fluido Supercrítico: *Quo Vadis?*", *Rev. Analytica*, 2002, 2, 30 – 36.
- [19] Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. "Método de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica", *Quim. Nova*, 2001, 24, 68 – 76.
- [20] Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. "Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers", *Anal. Chem.*, 1990, 62, 2145 – 2148.
- [21] Pawliszyn, J. "Applications of Solid Phase Microextraction", RSC, Letchworth, 1999
- [22] Pires, A. L.; Augusto, F. "Microextração por Fase Sólida", *Quim. Nova*, 2000, 23, 523 – 530.
- [23] Asten, A. V. "The importance of GC and GC-MS in perfume analysis", *Trend Anal. Chem.*, 2002, 21, 698 – 708.
- [24] Qu, Q.; Tucker, E.; Christian, S. D. "Solubilization of Synthetic Perfumes by Nonionic Surfactants and by Sulfoalkyl Ether β -CDs", *J. Inc. Phen. Mac. Chem.*, 2003, 45, 83 – 88.
- [25] Matos, G. D.; Pereira-Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z. "Análise Exploratória em Química Analítica com Emprego de Quimiometria: PCA e PCA de Imagens", *Rev. Anal.* 2003, 06, 38 – 50.
- [26] Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, M. B. "Chemometrics: A Practical Guide", Wiley, New York, 1998.
- [27] Brereton, R. G. "Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant", John Wiley, New York, 2002.
- [28] Neto, W. B. "Parâmetros de qualidade de lubrificantes e Óleo de Oliva através de Espectroscopia Vibracional, Calibração Multivariada e seleção de variáveis" Tese de Doutorado, Unicamp, 2005.
- [29] Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C. "Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos" *Quim. Nova*, 2007, 30, 481 – 487.
- [30] Dunlop, P. J.; Bignell, C. M.; Brooker, M. I. H.; Brophy, J. J.; Hibbert, D. B. "Use of gas chromatograms of essential leaf oils to compare eight taxa of *genus Angophora (Myrtaceae)*: possible relationship to the *genus Eucalyptus*", *Bio. Sys. Ecol.* 1999, 27, 815 – 830.
- [31] Bravo-Linares, C. M.; Mudge, S. M. "Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in sediments using in situ SPME sampling", *J. Environ. Monit.* 2007, 9, 411 – 418.
- [32] Smolinski, A.; Walczak, B.; Einax, J. "Hierarchical clustering extended with visual complements for interpretation of environment data set", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2002, 64, 45 – 54.
- [33] Branca, A.; Simonian P.; Ferrante, M.; Novas, E.; Negri, R. M. "Electronic nose based discrimination of a perfumery compound in a fragrance", *Sens. Actua. B*, 2003, 92, 222 – 227.

- [34] Gómez, A. H.; Wang, J.; Hu, G.; Pereira, A. G. "Discrimination of storage shelf-life for mandarin by electronic nose technique", *Leb. Wis. Tech.*, 2007, 40, 681 – 689.
- [35] *Multivariate Data Analysis for Windows, Version 3.02*, Infometrix, Inc.
- [36] Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe P. L. O. "Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial", *Quim. Nova*, 1999, 22, 724 – 731.
- [37] Grung, B.; Kvalheim, O. M. "Rank determination of spectroscopic profiles by means of cross validation. The effect of replicate measurements on the effective degrees of freedom", *Chem. Intell. Lab. Sys.*, 1994, 22, 115 – 125.
- [38] Bothe, F.; Dettmer, K.; Engewald, W. "Determination of Perfume Oil in Household Products by Headspace Solid-Phase Microextraction and Fast Capillary Gas Chromatography", *Chromatographia*, 2003, 57, Suppl., S-199 – S-206.
- [39] Penteadó, C. J.; Bruns, R. E.; Carvalho, L. R. F. "Factorial desing optimization of solid phase microextraction conditions for gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) analysis of linear alkylbenzenes (LABs) in detergents", *Anal. Chim. Acta*, 2006, 562, 152-157.
- [40] Ortiz, G.; Tena, M.T.; "Headspace soli-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method for the identification of cosmetic ingredients causing delamination of packagings", *J. Chromatogr.,A*, 2006, 1101, 32-32
- [41] Zhu, M.; "Rapid Study of Fragrance loss from Commercial Soap after Use by Solid Phase Microextraction-GC/MS and Olfactory Evaluation"; *Anal. Scien.*, 2006, 22, 1249 – 1251.
- [42] Chen, Y.; Begnaud, F.; Chaintreau, A.; Pawliszyn, J.; "Quantification of perfume compounds in shampoo using solid-phase microextraction", *Flavour Frag. J.*, 2006, 21, 822-832.
- [43] Herrmann, A.; Debonneville, C.; Laubscher V.; Aymard L.; "Dynamic headspace analysis of the light-induced controlled release of perfumery aldehydes and ketones from α -keto esters in bodycare and household applications", *Flavou Frag. J.* 2000, 15, 415-420.
- [44] Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoyanova, A.; Balinova, A.; Guangjiun, Z.; Xihan, M. "Solid phase microextraction / gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and fixative properties of the essential oil of *Rosa damascene* L. from China", *Flavour Frag. J.*, 2005, 20, 7-12.
- [45] Flumignan, D. L.; Ferreira, F. O.; Tininis, G. A.; Oliveira, J. E.; "Multivariate calibrations in gas chromatographic profiles for prediction of several physicochemical parameters of Brazilian commercial gasoline", *Chem. Intel. Lab. System*, 2008, 92, 53-60.
- [46] Fernandes, A. P. "Emprego de estratégias quimiométricas para a diferenciação de alimentos de acordo com as formas de produção", Tese de Doutorado, Universidade de São Carlos, 2006.
- [47] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos", *Quím. Nova*, 2004, 27, 771-780.